UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ÁDAMO DAVI DIÓGENES SIENA

**Análise bioinformática e caracterização funcional de RNAs longos
não-codificadores envolvidos na progressão do melanoma**

RIBEIRÃO PRETO

2021

ÁDAMO DAVI DIÓGENES SIENA

Análise bioinformática e caracterização funcional de RNAs longos não-codificadores envolvidos na progressão do melanoma

Versão original

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

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Wilson Araújo da Silva Jr

Co-orientadora: Dra. Josane de Freitas Sousa

RIBEIRÃO PRETO

2021

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.

Siena, Ádamo Davi Diógenes

Análise bioinformática e caracterização funcional de RNAs longos não-codificadores envolvidos na progressão do melanoma, 2021.

164 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Programa de Pós-Graduação em Genética. Área de concentração: Genética.

Orientador: Silva Jr, Wilson Araujo.

Co-orientadora: Sousa, Josane de Freitas.

1. Melanoma. 2. RNAs longos não-codificadores. 3. Progressão tumoral. 4. Biomarcador. 5. Resistência tumoral. 6. Vemurafenib. 7. Genes diferencialmente expressos. 8. Regiões diferencialmente metiladas. 9. Invasão.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Siena, Ádamo Davi Diógenes

Título: Análise bioinformática e caracterização funcional de RNAs longos não-codificadores envolvidos na progressão do melanoma.

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

Área de Concentração: Genética

Aprovado em: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho, bem como a sua apresentação em diversos congressos, foi realizado com o suporte financeiro das seguintes instituições e entidades:

- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP.
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES.
- Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência – FAEPA.
- Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – FMRP/USP.
- Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto – FUNDHERP

DEDICO

Ao meu pai,

que foi meu primeiro professor, é minha maior inspiração na vida, sempre me ensinou o caminho do bem e me apoia em todas as minhas escolhas.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Wilson Araújo Silva Jr, pela oportunidade, orientação, apoio às minhas decisões e contribuição para meu crescimento acadêmico e profissional;

Aos funcionários do departamento de Genética, em especial para Susie Nalon, secretária do Programa de Pós-Graduação em Genética, pela disponibilidade em ajudar sempre os alunos;

À Casa da Ciência, em especial à Profa. Dra. Marisa Ramos Barbieri, por ter um papel tão importante na transformação da vida de diversos alunos, dos quais eu me incluo, e que me apresentou o método científico e criou em mim o fascínio pelo conhecimento do mundo biológico;

À minha Profa. de Biologia do ensino fundamental, Leonízia Nakamura, que acreditou no meu potencial quando outros não puderam, insistiu na minha formação como aluno do ensino público e conseguiu despertar o meu potencial para a Biologia;

À Profa. Andrea Rentmeister, da Universidade de Münster na Alemanha, por ter aceitado colaborar com este trabalho e me recebeu em seu laboratório por um mês no ano passado, mas teve que interromper a colaboração pela expansão da pandemia Covid-19;

À Dra. Josane de Freitas Souza, minha co-orientadora, e que me auxiliou muito na parte metodológica no início deste trabalho, principalmente ajudando na análise e interpretação dos dados;

Ao Dr. Karthik Subramanian Chandrasekaran, que durante minha estadia na Universidade de Münster na Alemanha no ano passado, ajudou na realização dos experimentos e instruiu sobre o projeto que ia ser realizado naquela oportunidade;

À minha parceira, Thaís Coelho Thomazini, que foi essencial para que eu pudesse me manter firme e completar este trabalho, me apoiando em todas as minhas escolhas, multiplicando os momentos de felicidade e tornando a jornada mais leve. Obrigado, por dividir tudo isso comigo;

Aos amigos do Laboratório de Genética Molecular e Bioinformática (LGMB), em especial à Danielle Brotto, Isabela Ichihara, Jéssica Praça, Jéssica Santis, Camila Baldin, Greice Molfeta, Reginaldo Rosa, Simone Carvalho, Luiza Araújo, Carlos Biagi, João, Natália Scaraboto,

Graziela Moura por todos esses anos de convivência e ótimo ambiente de trabalho, cotidiano de aprendizado e apoio ao longo deste projeto;

Aos meus amigos, principalmente à Henrique Lopes, que sempre me apoiou em minha carreira, ajudou muito em períodos difíceis, e sempre se mostrou um grandioso amigo;

Ao meu primo Fábio Siena, que sempre esteve presente em todos os momentos, traz alegria e conforto para as pessoas ao seu redor e sempre foi uma pessoa incrível;

Ao meu irmão Isaías, sua esposa Kelly, e meus sobrinhos Fernando e Karoline, por estarem sempre me apoiando nas minhas escolhas;

À Julianne Vargas de Carvalho, pela sua ajuda com o experimento *wound healing* no manejo do microscópio confocal e captura das imagens nos determinados tempos;

Ao Dr. Felipe Freitas de Castro, por ter me recebido no seu laboratório e ter fornecido conhecimentos fundamentais de manipulação, cultivo, preparo e uso de bactérias competentes;

À Dra. Cibele Cardoso, por todo o suporte e ter me ensinado experimentos e conceitos fundamentais de clonagem molecular;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq, pela concessão de bolsa de Doutorado e pelo apoio financeiro para desenvolvimento desta pesquisa;

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP, pelo suporte estrutural, logístico, administrativo e financeiro provido via CEPID, fundamental para a realização desta pesquisa;

À Fundação Hemocentro de Ribeirão Preto, pelo suporte estrutural, administrativo e logístico, fundamental para a realização desta pesquisa;

À Fundação de Apoio Ao Ensino, Pesquisa e Assistência do HCFMRP-USP (FAEPA), pelo suporte financeiro para realização de atividades acadêmicas e desenvolvimento desta pesquisa;

***"I saw the angel in the marble
and carved until I set him free."***

Michelangelo

RESUMO

Siena, A. D. D. (2021). Análise bioinformática e caracterização funcional de RNAs longos não-codificadores envolvidos na progressão do melanoma. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

O melanoma representa cerca de 5% dos cânceres de pele, mas corresponde a 80% das mortes de pacientes acometidos. Quando detectado precocemente, tem grande chance de ressecção, mas em um cenário de metástase seu prognóstico é ruim. Ele é bem conhecido por alguns aspectos de sua agressividade e metástase, mas ainda é pouco compreendido como os ncRNAs podem impactá-lo. Os lncRNAs são transcritos de 200 nucleotídeos de comprimento, que não codificam proteínas e recentemente demonstraram papéis importantes na *melanomagenesis*. Neste estudo, exploramos lncRNAs diferencialmente expressos usando diferentes conjuntos de dados, incluindo nosso experimento de RNA-Seq prévio, e encontramos candidatos a lncRNA potencialmente impactando o melanoma. Nesta ocasião, apresentamos 3 lncRNAs que encontramos com expressão gênica desregulada e que exploramos posteriormente. Primeiro, usamos RNA-Seq e análises de bioinformática para investigar o lncRNA ZEB1-AS1 (ZEB1 antisense RNA 1) em amostras de melanoma. Este lncRNA apresentou maior expressão em melanoma metastático do que em melanoma primário e foi associado a mutações *hotspot* no gene BRAF e em genes da família RAS. Além disso, demonstrou uma correlação positiva na expressão gênica com sua contraparte codificadora ZEB1 (*zinc finger E-box binding homeobox 1*) em melanomas primários e metastáticos. Então, usando assinaturas de expressão gênica indicativas de fenótipos invasivos ou proliferativos, encontramos a superexpressão de ZEB1-AS1 associada positivamente ao perfil invasivo e negativamente associada ao perfil proliferativo. Além disso, realizamos a mesma análise no inédito lncRNA U73166, e decidimos dissecar funcionalmente seus efeitos no melanoma. Portanto, realizamos silenciamento deste transcrito e exploramos mais profundamente seus efeitos na proliferação, migração e invasão. Assim, descobrimos que o novo lncRNA U73166 impacta todos esses processos tumorais e, além disso, está associado à resistência ao Vemurafenib no melanoma. Essa resistência ao fármaco demonstra um aspecto promissor para que o lncRNA U73166 seja um importante biomarcador ou alvo no tratamento do melanoma. Além disso, combinamos nosso conjunto de dados de RNA-Seq e dados públicos de metilação de amostras melanocíticas para verificar os genes que abrigariam tanto a expressão diferencial do gene quanto as regiões de DNA diferencialmente metiladas. Deste modo, encontramos o

novo lncRNA PRAME-AS1, um transcrito anti-sentido do crucial mRNA específico do melanoma PRAME, que atende tanto a expressão diferencial do gene quanto a região diferencialmente metilada. Esse resultado utilizando dados de metilação e expressão gênica do lncRNA PRAME-AS1 sugere uma possível correlação de regulação gênica mediada por metilação de regiões promotoras. Nossos resultados, portanto, sugerem potenciais lncRNAs que afetam o desenvolvimento e a progressão do melanoma. Portanto, este estudo pode ser útil para pesquisas futuras, pois demonstra lncRNAs impactando o melanoma e que podem ser úteis como biomarcadores de agressividade, terapia direcionada e no manejo da resistência adquirida a medicamentos.

Palavras-chave: Melanoma, RNAs longos não-codificadores, Progressão tumoral, Biomarcador, Resistência tumoral, Vemurafenib, Genes diferencialmente expressos, Regiões diferencialmente metiladas, Invasão.

ABSTRACT

Siena, A. D. D. (2021). Bioinformatics analysis and functional characterization of long non-coding RNAs involved in the progression of melanoma. (Tese de Doutorado). Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

Melanoma comprises around of 5% of skin cancers, but it corresponds to 80% of patient deaths. When early detected, it has a high chance to resection, but in a metastasis scenario its prognosis is very worse. It is well known some aspects of melanoma aggressiveness and metastasis, but it still poorly understood how ncRNAs may impact it. The lncRNAs are transcripts 200 nucleotide long that do not encode proteins and recently had demonstrated key roles in melanomagenesis. In this study, we explored differentially expressed lncRNAs using different datasets, including our previous RNA-Seq experiment, and found potential lncRNA candidates impacting melanoma. Here, we present 3 lncRNAs that we found with deregulated gene expression and that we further explored. First, we used RNA-Seq and bioinformatics analysis to investigate the upregulated lncRNA ZEB1-AS1 (ZEB1 antisense RNA 1) in melanoma samples. It showed higher expression in metastatic than primary melanoma and it was associated with hotspot mutations in BRAF gene and RAS family genes. Also, it has demonstrated a positive correlation in gene expression with its coding counterpart ZEB1 (zinc finger E-box binding homeobox 1) in primary and metastatic melanomas. Then, using gene expression signatures indicative of invasive or proliferative phenotypes, we found ZEB1-AS1 upregulation positively associated with invasive profile and negatively associated with proliferative profile. Besides, we performed the same analysis in the novel lncRNA U73166, and we decided to functionally dissect its effects in melanoma. So, we knockdown this transcript and further explored its effects in proliferation, migration, and invasion. We found that the novel lncRNA U73166 impacts all these tumoral process, and beyond that, it is associated with Vemurafenib resistance in melanoma. This drug-resistance show a promising aspect for the lncRNA U73166 to be an important biomarker or target in melanoma treatment. Moreover, we used a combination of our RNA-Seq dataset and methylation public data of melanocytic samples to check genes that would harbor both differential gene expression and differential methylated DNA regions. We found a novel lncRNA PRAME-AS1, an antisense transcript of the crucial melanoma-specific mRNA PRAME, which attend both differential gene expression and differential methylation region. This result using methylation data and gene expression of the lncRNA PRAME-AS1 suggests a possible correlation of mean

regulation by methylation of promoter regions. Our results suggest potential lncRNAs affecting melanoma development and progression. Therefore, this study can be helpful for the future research as it demonstrates lncRNAs impacting melanoma and that can be useful as biomarkers of aggressiveness, targeted-therapy and in management of acquired drug-resistance.

Keywords: Melanoma, long non-coding RNAs, Tumor progression, Biomarker, Drug resistance, Vemurafenib, Differential genes, Differential methylated regions, Invasion.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C	Graus Celsius
µg	micrograma
µL	microlitro
µM	micromolar
ATP	Adenosina Trifosfato
BLAST	Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local
BP	Processos biológicos
CaCl ₂	Cloreto de cálcio
CC	Componentes celulares
cDNA	DNA complementar
CEP	Comitê de Ética e Pesquisa
CO ₂	Dióxido de carbono
COHCAP	<i>City of Hope CpG Island Analysis Pipeline</i>
CPM	Counts per million
DEG	Genes diferencialmente expressos
DH5α	Cepa bacteriana de Escherichia coli
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's medium
DMRs	Regiões diferencialmente metiladas
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNase I	Endonuclease Deoxirribonuclease I
DP	Desvio padrão
FC	<i>Fold change</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FPKM	<i>Fragments per kilo base per million mapped reads</i>
g	gramas
GEO	<i>Gene Expression Omnibus</i>
GSVA	<i>Gene Set Variation Analysis</i>
GTE _x	<i>Genotype Tissue Expression</i>
h	Hora
HCl	Ácido clorídrico
HU	Hospital Universitário
ilhas CpG	Sequências de DNA em GC e rico em CpG
kb	kilobase
LB	Luria-Bertani
lncRNA	RNA longo não-codificador
M	Molar
MELC	Grupo representativo composto por exclusivamente células de melanócitos
MET	Grupo representativo composto por exclusivamente células de melanoma metastático
MF	Função molecular
min	Minutos
miRNA	Micro RNA
mL	Mililitro
mM	Milimolar

mm	Milímetros
mRNA	RNA mensageiro (ou codificador de proteínas)
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ncRNA	RNAs não-codificador
ng	Nanograma
NGS	Sequenciamento de nova geração
nm	Nanômetro
nt	Nucleotídeos
OD	Densidade ótica
ORA	Over-Representation Analysis
PBS	Tampão Salina-Fosfato
PCA	Análise de componentes principais
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PRIM	Grupo representativo composto por exclusivamente células de melanoma primário
RBP	RNA binding protein
RNA-Seq	Sequenciamento de RNA de nova geração
RNA	Ácido ribonucleico
RNAse A	Endonuclease ribonuclease A
RPM	Rotações por minuto
rRNA	RNA ribossômico
RT-qPCR	PCR quantitativa após transcrição reversa
SDS	Dodecil sulfato de sódio
seg	segundos
SFB	Fetal Bovino inativado
shRNA	Short hairpin RNA
siRNAs	Short interfering RNA
SKCM	Skin Cancer Melanoma (amostras do TCGA)
SP	São Paulo
TCGA	The cancer Genome Atlas
TMM	Trimmed Mean of M-values
TPM	Transcritos Por Milhão
tRNA	RNA transportador
TSS	Sítio de início da transcrição
USP	Universidade de São Paulo
v/p	Volume por peso
v/v	Volume por volume
WebGestalt	WEB-based Gene Set Analysis Toolkit
β	Valor de metilação "beta"

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	20
1.1. Câncer de pele	20
1.2. Câncer de pele melanoma	20
1.3. Principais mutações associadas ao melanoma.....	22
1.4. Tratamento do melanoma	23
1.5. RNAs não-codificadores	24
1.6. RNAs longos não-codificadores	25
1.7. lncRNAs e o seu papel no melanoma	26
2. OBJETIVOS	27
2.1. Objetivos gerais.....	27
2.2. Objetivos específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	28
3.1. Ferramentas e análises de bioinformática	28
3.1.1. RNA-Seq: mapeamento, anotação e quantificação de transcritos	28
3.1.2. Dados públicos de RNA-Seq de linhagens celulares de melanoma.....	28
3.1.3. Normalização dos dados e expressão diferencial gênica	29
3.1.4. Dados públicos obtidos do projeto <i>The Cancer Genome Atlas</i> (TCGA) e do <i>Genotype-Tissue Expression</i> (GTEx).....	29
3.1.5. <i>Gene Set Variation Analysis</i> (GSVA) e assinaturas de expressão gênica para definição de score proliferativo e invasivo	30
3.1.6. Dados públicos de metilação de DNA de linhagens celulares e amostras de melanoma	30
3.1.7. Análise de correlação de expressão gênica	31
3.1.8. Ontologia genética e análise de enriquecimento de vias	31
3.2. Experimentos funcionais	32

3.2.1. Linhagens celulares e Condições de Cultivo	32
3.2.1.1. Critério para divisão dos grupos de progressão do melanoma	32
3.2.2. Linhagens melanocíticas que compõem os grupos de progressão do melanoma e condições de cultivo	32
3.2.3. Obtenção de linhagens celulares resistentes à Vemurafenib	33
3.2.4. Isolamento e preparo de RNA total	34
3.2.4.1. Extração de RNA e controle de qualidade	34
3.2.4.2. Tratamento com DNase I e síntese de cDNA	35
3.2.5. Isolamento de frações nucleares e citoplasmáticas de linhagens celulares melanocíticas	35
3.2.6. Análise dos níveis de expressão gênica utilizando RT-qPCR	36
3.2.7. Construção dos vetores de silenciamento	37
3.2.7.1. O vetor PLKO.1 para expressão de shRNAs (<i>short hairpin RNAs</i>)	37
3.2.7.2. Digestão enzimática e linearização do PLKO.1	39
3.2.7.3. Desenho de shRNAs para inserção em PLKO.1	39
3.2.7.4. Pareamento dos oligos de shRNA e ligação ao vetor PLKO.1	40
3.2.8. Preparo de meio de cultura de bactérias	41
3.2.9. Preparo de bactérias competentes	41
3.2.10. Transformação de bactérias competentes	42
3.2.11. Minipreparação dos plasmídeos com protocolo de lise alcalina	42
3.2.12. Seleção de clones e sequenciamento das minipreps	43
3.2.13. Produção de partículas lentivirais	44
3.2.14. Ensaio de proliferação	45
3.2.15. Ensaio de migração	45
3.2.16. Ensaio de Invasão	46
3.2.17. Ensaio de <i>Wound Healing</i>	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Visão geral do conjunto de dados de RNA-Seq	47

4.2. Expressão diferencial gênica entre linhagens celulares de melanócitos, linhagens celulares de melanoma primário e melanoma metastático	49
4.3. O lncRNA ZEB1-AS1 (ENSG00000237036)	51
4.3.1. O lncRNA ZEB1-AS1 está super-expresso em linhagens celulares de melanoma primário e metastático quando comparados com melanócitos	51
4.3.2. Os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e ZEB1 estão positivamente correlacionados e associados com mutações frequentes em melanoma.....	52
4.3.3. Associação entre a expressão do lncRNA ZEB1-AS1 com o fenótipo invasivo em melanoma	57
4.3.4. Ontologia gênica e anotação funcional de genes co-expressos com ZEB1-AS1 em melanoma	59
4.4. O lncRNA U73166 (ENSG00000230454).....	62
4.4.1. O novo lncRNA U73166 possui expressão desregulada em amostras de melanoma metastático quando comparado com melanócitos	62
4.4.2. Associação entre a expressão do gene lncRNA U73166 com fenótipo invasivo de melanoma	63
4.4.3. O lncRNA U73166 possui um padrão de expressão do tipo melanoma-testículo.....	63
4.4.4. O silenciamento do lncRNA U73166 demonstra associação deste transcrito com proliferação e invasão.....	65
4.4.5. O silenciamento de lncRNA U73166 impacta a migração celular	66
4.4.6. A análise da fração subcelular demonstra o enriquecimento nuclear do lncRNA U73166.....	68
4.4.7. Linhagens celulares de melanoma e dados públicos indicam associação do lncRNA U73166 com resistência a Vemurafenib em mutantes BRAFV600E.....	70
4.4.8. O lncRNA U73166 interage com diversas proteínas e é um mediador potencial do processamento de RNA no câncer.	71
4.5. O lncRNA PRAME-AS1 (ENSG00000220891)	72

4.5.1. O novo lncRNA PRAME-AS1 possui expressão desregulada em amostras de melanoma primário quando comparado com melanócitos	72
4.5.2. O lncRNA PRAME-AS1 possui padrão de expressão do tipo Cancer-Testis (CT).....	73
4.5.3. O lncRNA PRAME-AS1 está positivamente correlacionado com o mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma primário	75
4.5.4. Análise de frações subcelulares do lncRNA PRAME-AS1 não demonstram presença restrita ao núcleo ou ao citoplasma	76
4.5.5. Análise de dados públicos de metilação de DNA de linhagens melanocíticas.....	77
5. DISCUSSÃO	83
6. CONCLUSÕES	93
7. BIBLIOGRAFIA.....	104
8. APÊNDICE	118
8.1. Artigos resultantes deste estudo.....	118
8.1.1. Manuscrito publicado em 2019	118
8.1.2. Manuscrito submetido para publicação em 2021	137

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de pele

O câncer de pele tem distribuição universal e trata-se do câncer de ocorrência mais frequente na população brasileira (INCA, 2014). O câncer de pele pode ser classificado de acordo com as células que dão origem à neoplasia devido à diversidade de células que compõem a pele. Assim, o câncer de pele pode ser dividido em dois tipos principais: câncer de pele melanoma e não melanoma. O câncer de pele não melanoma possui origem principalmente em células basais ou em células escamosas, sendo estes denominados como carcinoma de células basais e carcinoma de células escamosas, respectivamente (Albert & Weinstock, 2003; Reinhard Dummer, Mark R. Pittelkow, Keiji Iwatsuki, Adèle Green, 2011).

1.2. Câncer de pele melanoma

O câncer de pele do tipo melanoma é originado de melanócitos, possui baixa frequência (aproximadamente 5% dos casos de câncer de pele), mas apresenta alta letalidade, chegando a cerca de 80% dos casos (American Cancer Society, 2014; INCA, 2002; Miller e Mihm, 2006). A alta mortalidade associada ao melanoma é associada principalmente à sua capacidade de desenvolver metástases nos linfonodos regionais e órgãos longínquos, além de possuir eficiência terapêutica limitada (INCA, 2002; MacKie, Hauschild e Eggermont, 2009).

Em relação à incidência, nos Estados Unidos são estimados para o ano de 2021 aproximadamente 101,280 novos casos de melanoma diagnosticados, dos quais são estimadas 7,180 mortes (Siegel et al., 2021). Para o Brasil, no período de 2021 são estimadas cerca de 8.450 novos casos de melanoma entre ambos os sexos (INCA, n.d.). É importante ressaltar que, nas últimas décadas, houve aumento de 4-6% na incidência anual de melanoma em diversas regiões do planeta, como Europa, Oceania e América do Norte (Reinhard Dummer, Mark R. Pittelkow, Keiji Iwatsuki, Adèle Green, 2011).

A progressão tumoral do melanoma apresenta uma sequência de etapas bem definidas por evidências clínicas e histopatológicas. Essa progressão evolui de lesões proliferativas benignas, passando por melanomas primários sem evidências de metástase, chegando a lesões invasivas primárias e, finalmente, evoluindo para metástase (Herlyn, 1990). As etapas de progressão e

metástase do melanoma são retratadas em maiores detalhes pelo clássico modelo de Clark (Clark et al., 1984). Neste modelo, são assumidos seis etapas principais na tumorigênese do melanoma (Figura 1), sendo eles: (I) nevo melanocítico comum; (II) nevo melanocítico com hiperplasia melanocítico lentiginosa, ou seja, diferenciação aberrante; (III) nevo melanocítico com diferenciação aberrante, ou displasia melanocítica; (IV) fase de crescimento radial de melanoma primário (RGP); (V) fase de crescimento vertical de melanoma primário (VGP); e, por fim, (VI) melanoma metastático (Clark et al., 1984; Hussein, 2004). Contudo, os mecanismos de progressão do melanoma são processos dinâmicos, que ainda estão revelando caminhos menos lineares e muito mais complexos do que se conhecia até o momento (Damsky et al., 2014).

Figura 1 – Modelo de progressão do melanoma

Figura 1 - Modelo de progressão do melanoma demonstrando a divisão entre as diferentes fases do melanoma e evolução tumoral segundo o modelo de Clark. Fonte: Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006).

1.3. Principais mutações associadas ao melanoma

O principal gene associado ao melanoma é o gene BRAF (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase). Este gene encontra-se no locus 7q34 e codifica proteínas RAF incluindo as isoformas ARAF, BRAF e CRAF, que são proteínas do tipo quinase serina/treonina e que atuam na via MAPK (Mitogen-Activated Protein Kinases) transmitindo sinais externos para o núcleo celular e já foi associado a diversos tipos de câncer (Alqathama, 2020; Ascierto et al., 2012; Davies et al., 2002). No melanoma maligno, mutações neste gene estão presentes em aproximadamente 50% dos casos (Ascierto et al., 2012; Davies et al., 2002; Hélias-Rodzewicz et al., 2015; Hodis et al., 2012; Jang & Atkins, 2013; Kumar et al., 2003). Nestes casos, a mutação mais frequente (aproximadamente 90%) encontra-se no códon de número 600 (BRAFFV600E), e afeta os domínios quinase e a conformação ativa da proteína (Ascierto et al., 2012; Davies et al., 2002; McCain, 2013). Além disso, mutações no gene BRAF são bem conhecidas por impactar na invasão e, consequentemente, na metástase de melanoma (Alqathama, 2020).

Além disso, outro gene com impacto no desenvolvimento de melanoma é o CDKN2A (Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 2A), que codifica duas proteínas (por meio de *splicing* alternativo) sem homologia de aminoácidos p16^{INK4a} e p14^{ARF} (Chin et al., 2006; Hodis et al., 2012). Nesse gene, a deleção de seu locus (9p21) já foi associada ao melanoma familiar (Cannon-Albright et al., 1992; Hodis et al., 2012; Nancarrow et al., 1993; Petty et al., 1993) e também pode possuir mutações de linhagem germinativa (Gruis et al., 1995; Harland et al., 1997; Hussussian et al., 1994). Além disso, outro gene importante é o gene CDK4 (Cyclin-Dependent Kinase 4), responsável por gerar o alvo primário da proteína p16^{INK4a}, e que também apresenta envolvimento com o melanoma familiar (Zuo et al., 1996).

Em relação aos genes que também foram descritos para o melanoma não familiar estão incluídos os genes associados ao reparo de DNA que são da família gênica XP (Reinhard Dummer, Mark R. Pittelkow, Keiji Iwatsuki, Adèle Green, 2011). Este genes também estão associados ao *Xeroderma Pigmentosum* e possuem alta correlação com o desenvolvimento de melanoma (Kraemer, 1997; Kraemer et al., 1994). Adicionalmente, já foram identificadas deleções ou mutações no gene PTEN (Phosphatase and Tensin Homolog) e que estão associadas ao surgimento e progressão de melanoma (Celebi et al., 2000; Dong et al., 2014; H. Wu et al., 2003).

Além disso, cerca de 20% dos melanomas cutâneos apresentam mutações no gene NRAS (Neuroblastoma Ras Viral Oncogene Homolog) e que resultam em ganho de função deste oncogene (Funck-Brentano et al., 2016; J.-H. Lee et al., 2011). Mutações nesse gene têm sido associadas com instabilidade cromossômica e níveis altos na progressão do melanoma metastático (Funck-Brentano et al., 2016). A principal mutação associada à este gene em melanoma ocorre pela substituição de uma leucina por uma glutamina na posição 61 desta proteína e mutações em outras isoformas (HRAS ou KRAS) são consideradas bastante raras em melanoma (Furue & Kadono, 2016; Whitwam et al., 2007).

1.4. Tratamento do melanoma

Existem alguns tratamentos para o melanoma, sendo a cirurgia de remoção do melanoma local, radioterapia e a quimioterapia considerados o padrão (Alqathama, 2020). Em relação à quimioterapia, os inibidores específicos podem ser divididos entre: inibidores de primeira geração, como *High-dose interleukin-2* (HDIL-2) ou Interferon- α (IFN- α); inibidores de segunda geração, como Anti-PD1 (Lambrolizumab, Nivolumab, Spartalizumab), anti-PD-L1 (Atezolizumab) ou Anti-CTLA-4 (Ipilimumab); e os inibidores de terceira geração pan-RAF (Alqathama, 2020). Além disso, é possível uma combinação entre diferentes inibidores. Atualmente, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem aprovado para tratamento de melanoma como monoterapia os inibidores PD-1, inibidores de CTLA-4, inibidores de MEK, inibidores de BRAF e o TVEC (*Talimogene Laherparepvec*) (Bommareddy et al., 2017; FDA, n.d.-a, n.d.-b).

A relevância da mutação BRAFV600E se dá pela sua frequência, como citado, que fica em torno de 50% nos pacientes com melanoma. Assim, este foi a primeira terapia direcionada e um dos principais pontos de atuação de inibidores de BRAF que visam diminuir a atividade dessa proteína (Riefolo et al., 2019). Esse tratamento teve sucesso inicial, porém o desenvolvimento de mecanismos de resistência em muitos pacientes ainda é um desafio significativo, pois ocorre recorrência da doença ou falta de resposta ao tratamento em torno de 15% dos casos (Alqathama, 2020). Além disso, a base molecular da resistência do melanoma aos quimioterápicos parece ser multifatorial, incluindo problemas no sistema de transporte de fármacos, alterações de apoptose e via apoptótica e alterações nos sistemas enzimáticos responsáveis pelo metabolismo celular (Kalal et al., 2017).

1.5. RNAs não-codificadores

Nas últimas décadas, foi revelado que a maior parte do genoma humano não codifica proteínas, e o termo “DNA-lixo” (Ohno, 1972) passou a ser questionado. Evidências demonstraram que somente cerca de 2% do genoma humano possui capacidade de gerar proteínas (IHGSC, 2004), mas por outro lado, os transcritos primários cobrem 74,7% do genoma, sendo que os transcritos processados abrangem 62,1% de todo o genoma humano (Djebali et al., 2012).

Recentemente, a utilização de novas tecnologias de sequenciamento – como o sequenciamento de nova geração (NGS) – e novas abordagens bioinformáticas permitiram muitos avanços no campo da genômica (Meyerson et al., 2010; J. Zhang et al., 2011). Deste modo, é cada vez maior o número de RNAs não-codificadores de proteínas (ncRNAs) que são descobertos com envolvimento na regulação da expressão gênica em diversos níveis. Muitos destes ncRNAs possuem papel fundamental em processos celulares e desenvolvimento dos organismos, sendo portanto também conhecidos como RNAs regulatórios (Eddy, 2001; Erdmann et al., 2001; Morris & Mattick, 2014).

Algumas características destes ncRNAs os tornam excelentes moléculas para atividade de regulação gênica. Entre as principais características estão a capacidade de mobilidade entre compartimentos, síntese e degradação rápidas, capacidade de interação com proteínas estruturais (até mesmo regulatórias), DNA e outros RNAs através da complementaridade de bases (Berretta & Morillon, 2009). Além disso, a o fator de acontecer a transcrição por si só teria importante papel na regulação da expressão gênica, pois com a sua ativação seria possível alterar a conformação da cromatina (Berretta & Morillon, 2009).

Dentre os RNAs que possuem papel regulatório, os miRNAs causaram uma revolução no campo e provavelmente têm sido os que mais foram estudados nas últimas décadas (Morris & Mattick, 2014). Os miRNAs possuem aproximadamente 22 nucleotídeos e desempenham papéis importantes em diversos organismos, principalmente por meio da clivagem ou repressão da tradução de mRNAs (Bartel, 2004). Contudo, mesmo sendo um dos principais e mais estudados ncRNAs, os miRNAs ainda não deixam de ser cada vez mais estudados através, por exemplo, de atuação em vias não-canônicas e até mesmo como moléculas fundamentais na comunicação extracelular (O’Brien et al., 2018). Deste modo, não há esgotamento de estudos

relacionados aos ncRNAs, e por mais que tenha sido extensivamente abordado, ainda existe um campo muito aberto de pesquisa.

1.6. RNAs longos não-codificadores

Nas últimas décadas, os RNAs longos não-codificadores (do inglês, *long noncoding RNAs* - lncRNAs) estão cada vez mais sendo estudados e associados com a regulação da expressão gênica. Um precursor nesta área e amplamente estudado é o lncRNA XIST (X Inactive Specific Transcript), que atua em mecanismos epigenéticos da compensação de dose em mamíferos (Brown et al., 1991; Prensner & Chinnaiyan, 2011). Existem outros exemplos bem conhecidos no *imprinting* genômico (Y. Chen et al., 2009; Nagano et al., 2008), tal como o lncRNA AIR (Antisense of IGF2R Non-Protein Coding RNA), que atua regulando um *cluster* de genes autossômicos do cromossomo 17 (Sleutels et al., 2002), ou o lncRNA H19 (H19, Imprinted Maternally Expressed Transcript), que atua no crescimento celular (Gabory et al., 2009).

De modo genérico, os lncRNAs podem ser definidos como transcritos endógenos que apresentam tamanho igual ou maior que 200 nucleotídeos de comprimento, e sem capacidade de dar origem a proteínas (Derrien et al., 2012). Contudo, são muito similares ao RNA mensageiro, pois são transcritos pela RNA polimerase II (e também pela RNA polimerase III), sofrem *splicing*, poliadenilação na região 3' (cauda poli-A) e recebem capeamento (cap 5') de 7-metil-guanosina na extremidade 5' (Nie et al., 2012). Os lncRNAs se revelaram como uma fundamental parte da informação genômica dos organismos (Morris & Mattick, 2014), e que já apresentaram papéis fundamentais em muitos processos biológicos. Entre os principais mecanismos de atuação, podem estar: interação com outros fatores e formação dos complexos de modificação de cromatina (Guttman et al., 2011; Khalil et al., 2009; Tsai et al., 2010); competição endógena com mRNA por sítios alvo de reconhecimento e ligação de miRNA (Cesana et al., 2011; Karreth et al., 2011; Salmena et al., 2011; Sumazin et al., 2011; Tay et al., 2011); auxílio no recrutamento de RNAs para vias de degradação (Gong & Maquat, 2011); e atuação como isca para fatores de transcrição ou de *splicing* (Kino et al., 2010; Tripathi et al., 2010).

Deste modo, os lncRNAs podem ser considerados reguladores-chaves da expressão gênica e cuja desregulação já foi identificada no desenvolvimento do câncer (NIE et al., 2012).

A atuação dos lncRNAs na biogênese do câncer de forma oncogênica ou de supressor tumoral já foi relatada diversas vezes (HUARTE; RINN, 2010; PRENSNER; CHINNAIYAN, 2011). Dentre os lncRNAs já descritos como oncogênicos o lncRNA MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1) possui destaque. Este lncRNA possui ~ 8,5 kb e desempenha papel fundamental na proliferação celular, migração e invasão (JI et al., 2003). O MALAT1 está superexpresso nos tumores de pulmão, próstata, fígado, cólon e mama (JI et al., 2003; LUO et al., 2006; LIN et al., 2007; GUFFANTI et al., 2009; SCHMIDT et al., 2011; NIE et al., 2012). Além disso, dentre os transcritos supressores tumorais, um dos lncRNAs mais estudados é o MEG3 (Maternally Expressed 3), que é um regulador positivo da proteína P53 (Tumor Protein P53), e cuja expressão está inativada em tumores de glândula pituitária (CHUNHAROJRITH et al., 2015), meningioma (ZHANG et al., 2010) e carcinoma de tireoide (WANG et al., 2015). Na literatura, existem muitos lncRNAs relacionados à carcinogênese e cujos mecanismos de ação são diversos. Caracterizar os domínios de interação de lncRNAs, bem como compreender os mecanismos destes na tumorigênese, metástase e progressão do câncer são desafios que requerem investigações amplas e diversificadas (NIE et al., 2012).

1.7. lncRNAs e o seu papel no melanoma

Recentemente, o número de estudos voltados para identificação e caracterização de lncRNAs em melanoma revelaram importantes atuações destas moléculas no desenvolvimento deste tipo de câncer. Neste aspecto, já foram identificados alguns lncRNAs como a super-expressão do lncRNA BANCR (BRAF-Activated Non-coding RNA) em melanomas malignos, e seu envolvimento, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, com a proliferação das células de melanoma (R. Li et al., 2014). Mazar *et al.*, (2014) em seu trabalho, demonstrou que a expressão de SPRY4-IT1 (SPRY4 Intronic Transcript 1) é baixa em melanócitos humanos normais, mas se apresenta enriquecida em células tumorais de melanoma, sendo correlacionado à invasão, proliferação e apoptose (Mazar et al., 2014). De modo geral, no melanoma já foram identificados lncRNAs associados a proliferação (Goedert et al., 2016; R. Li et al., 2014; Wei et al., 2016), invasão (L. Chen et al., 2016; L. Tang et al., 2013) e apoptose (Khaitan et al., 2011; Leucci et al., 2016). De qualquer modo, ainda é escasso o número de estudos de associação e impacto da influência dos lncRNAs na progressão do melanoma.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivos gerais

Analisar e caracterizar lncRNAs associados aos mecanismos de desenvolvimento tumoral em linhagens celulares melanocíticas utilizando abordagens *in silico* e *in vitro*.

2.2. Objetivos específicos

- a) Reprocessar e analisar amplamente os dados de RNA-Seq de linhagens melanocíticas realizado durante o mestrado, com uma análise baseada na combinação de dados gerados pelo nosso grupo e dados públicos;
- b) Analisar a expressão gênica diferencial de lncRNAs nos grupos definidos de células melanocíticas e avaliar lncRNAs com potencial de impacto na progressão do melanoma;
- c) Realizar análises bioinformáticas adicionais para avaliar associação de novos lncRNAs com aspectos tumorais e identificar potenciais candidatos para análises funcionais;
- d) Realizar ensaios funcionais *in vitro* de acordo com base nos achados *in silico* e analisar o possível efeito de lncRNAs alvos em processos tumorais relevantes;
- e) Verificar a existência de lncRNAs com expressão desregulada em todas as fases do melanoma quando comparado com melanócitos e explorar seus impactos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Ferramentas e análises de bioinformática

3.1.1. RNA-Seq: mapeamento, anotação e quantificação de transcritos

Os dados de RNA-Seq em formato BAM obtidos por nosso grupo previamente (*in house*) foram reanalisados, sendo mapeados e quantificados novamente utilizando-se algoritmos diferentes daqueles utilizados anteriormente (Siena et al., 2019). Para mapeamento e quantificação da expressão gênica, foi utilizado o STAR v2.5 (Dobin et al., 2013), de acordo com o parâmetro padrão do pacote, e as quantificações foram exibidas como CPM (contagens por milhão). Para isto, foram utilizadas as anotações gênicas de lncRNAs provenientes do GENCODE *Release 25* (GRCh38). Assim, com a utilização do arquivo GTF foi possível obter arquivos FASTQ, identificar e categorizar os diferentes biótipos dos lncRNAs encontrados nas amostras de melanoma provenientes do RNA-Seq.

3.1.2. Dados públicos de RNA-Seq de linhagens celulares de melanoma

Os dados públicos brutos de RNA-Seq (*public data*) de linhagens celulares de melanócito (MC502), melanoma primário (A375) e melanoma metastático (A2058, C32, MALME3M, SKMEL28, SKMEL5 e WM2664) foram obtidos da plataforma Gene Expression Omnibus (GEO), sob o código de acesso GSE46818 (Pawlikowski et al., 2013). Então, foi realizada a conversão dos arquivos de sequências para arquivos do formato FASTQ, que são compatíveis com os dados gerados pelo nosso grupo e para viabilizar as análises das próximas etapas. Esta conversão foi realizada utilizando-se a ferramenta *SRA Toolkit* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?cmd=show&f=software&m=software&s=software>). Ambos os dados de RNA-Seq gerados pelo nosso grupo e obtidos de repositório público foram agregados em um único conjunto de dados para normalização e análises posteriores.

3.1.3. Normalização dos dados e expressão diferencial gênica

O conjunto de dados de RNA-seq (*in house* e *public data*) foram normalizados usando o método *Trimmed Mean of M-values* (TMM) para evitar viés durante a análise, pois os dados são provenientes de dois experimentos diferentes. Em seguida, foi realizado o processamento de dados, e a expressão gênica diferencial foi realizada utilizando o pacote *EdgeR* versão 3.16.5 (Robinson et al., 2009) disponível no Bioconductor e utilizando a linguagem de programação estatística R versão 3.2.2. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentaram valores de *P* ajustados $<0,05$ e *Fold Change* (FC) ≤ -2 para genes sub-expressos e ≥ 2 para genes super-expressos.

3.1.4. Dados públicos obtidos do projeto *The Cancer Genome Atlas* (TCGA) e do *Genotype-Tissue Expression* (GTEx).

Dados de expressão gênica de amostras de tumor primário ($n = 100$) e metastático ($n = 364$) foram obtidos do portal TCGA, via repositório UCSC (XENABROWSER) e oncoNcRNA (Z.-L. Wang et al., 2017). Os dados clínicos dessas amostras foram obtidos da plataforma cBioPortal (Gao et al., 2013), e foram classificados por seu código de barras em quatro grupos principais. Estes grupos foram estabelecidos de acordo com a presença ou não de mutações de maior prevalência em melanoma cutâneo. Deste modo, as amostras foram classificadas entre os grupos BRAF ($n = 150$), NF1 ($n = 28$), RAS ($n = 92$) ou *Triple Wild-Type* ($n = 46$), esta última eram classificadas as amostras que não se encaixavam em nenhum dos anteriores. Estes grupos foram determinados pela equipe do TCGA e são considerados para a classificação molecular genômica do melanoma (Akbani et al., 2015).

Além disso, para efeitos comparativos foram obtidos valores de expressão gênica de 31 tipos diferentes de tumor do TCGA, e valores de expressão gênica de 53 tipos diferentes de tecidos normais do consórcio GTEx. Estes valores de expressão gênica em tecidos normais e tumorais foram obtidos utilizando a plataforma GEPIA (Z. Tang et al., 2017).

3.1.5. *Gene Set Variation Analysis* (GSVA) e assinaturas de expressão gênica para definição de score proliferativo e invasivo

A abordagem GSVA foi utilizada para definir um *score* de enriquecimento (ES), que representa o grau de enriquecimento de um conjunto de genes em cada amostra de um determinado conjunto de dados (Barbie et al., 2009; Hänzelmann et al., 2013). Para isto, foram utilizadas assinaturas gênicas do trabalho de Widmer et al. (2012), que poderiam determinar se uma dada amostra possui *status* invasivo ou proliferativo (Widmer et al., 2012). Cada uma dessas assinaturas gênicas é composta por um número de genes sendo a assinatura de *status* invasivo composta por 45 genes, e a assinatura de *status* proliferativo composta por 52 genes (Tabela 1 e 2, respectivamente). Assim, foram analisadas as assinaturas de proliferação e invasão e o valor de expressão de um determinado lncRNA de interesse. Portanto, utilizando essa abordagem foi possível determinar a relação entre expressão de um determinado lncRNA com o ES invasivo ou proliferativo e analisar linhagens celulares de melanoma e amostras tumorais provenientes do TCGA.

3.1.6. Dados públicos de metilação de DNA de linhagens celulares e amostras de melanoma

Foi realizado o download de dados públicos de metilação disponibilizados publicamente na plataforma GEO, sob o código de acesso GSE51547 (Lauss et al., 2015). Nesse conjunto de dados, estão contidas informações de valores de metilação em melanócitos ($n = 3$), linhagens celulares de melanoma ($n = 9$) e amostras estágio III/IV de melanoma cutâneo ($n = 50$). Os dados obtidos por meio da plataforma *Illumina Infinium HumanMethylation450K* (ILLUMINA) permitem investigar mais de 450.000 locais de metilação, dentro e fora das ilhas CpG. As linhagens celulares de melanoma foram agrupadas com as amostras estágio III/IV de melanoma e então foram comparadas com os melanócitos para análise de metilação diferencial.

Esses dados foram analisados por dois pacotes distintos e implementados na plataforma de análise estatística R. O pacote *City of Hope CpG Island Analysis Pipeline* (COHCAP)(C. Warden, 2014; C. D. Warden et al., 2013) é capaz de fornecer estatísticas para ilhas CpG e lista de locais diferencialmente metilados. Já o pacote *DMRcate* (Peters et al., 2015) possui como principal função a estimativa de uma comparação nula para identificar regiões diferencialmente

metiladas (ou variáveis). Para realizar extrair informações genômicas relacionadas à intervalos que podem estar cobertos por sondas diferencialmente metiladas, foi utilizada a ferramenta multifuncional BEDTOOLS (Quinlan & Hall, 2010).

3.1.7. Análise de correlação de expressão gênica

Para verificar se existia correlação entre os valores de expressão de um lncRNA de interesse e os demais genes do transcriptoma foi realizada uma análise de correlação positiva e negativa. Assim, o valor de expressão de um lncRNA de interesse e a expressão de todos os outros genes anotados em amostras de melanoma do TCGA foram analisados pelo coeficiente de correlação de Pearson. Deste modo, foram obtidos os genes significativamente correlacionados, de tal modo que a correlação apresentada foi negativa quando $r \leq -0,3$ e positiva quando $r \geq 0,3$. Para ambas as correlações, positiva e negativa, os valores assumidos para ser considerado estatisticamente significativo foi de $P < 0,01$.

3.1.8. Ontologia genética e análise de enriquecimento de vias

A partir do conjunto de genes correlacionados positivamente e negativamente com determinado lncRNA obtido anteriormente foi possível realizar a anotação funcional e enriquecimento de vias. Deste modo, buscou-se explorar possíveis aspectos em que o lncRNA em questão poderia estar envolvido, baseado no conjunto de genes que estariam com expressão associada à expressão do lncRNA. A partir da lista de genes significativamente correlacionados, foi realizada a ontologia gênica na categoria “*Over-Representation Analysis (ORA)*”. A base de dados de categorias funcionais analisadas foi processos biológicos (BP), componentes celulares (CC) e função molecular (MF). Após estas análises, para cada categoria foram elencados os termos com maior índice, ou seja, aqueles que apresentaram o maior número de genes associados. Com a mesma lista de genes positivamente e negativamente correlacionados com o lncRNA de interesse utilizada anteriormente foi realizado o enriquecimento de vias. O método escolhido foi o *Reactome*, e, similar à ontologia gênica, foram elencadas as principais vias que o lncRNA de interesse poderia estar associado pela correlação de expressão com

determinado conjunto de genes. Ambas as análises foram realizadas por meio da ferramenta *WEB-based Gene Set Analysis Toolkit* (WebGestalt) (B. Zhang et al., 2005) .

3.2.Experimentos funcionais

3.2.1. Linhagens celulares e Condições de Cultivo

3.2.1.1. Critério para divisão dos grupos de progressão do melanoma

As linhagens celulares melanocíticas foram cultivadas de acordo com instruções específicas determinadas por protocolos bem estabelecidos e que foram adotados pelo nosso grupo. Notavelmente, as células melanocíticas foram divididas em 3 principais grupos, que representam as fases de progressão do melanoma, sendo eles: melanócitos (MELC, n = 5), melanomas primários (PRIM, n = 6) e melanomas metastáticos (MET, n = 6). Deste modo, buscamos definir estes grupos de maneira mais abrangente, pois permitiria analisar aspectos importantes da progressão do melanoma de uma fase para outra, e como os lncRNAs poderiam estar associados com tais aspectos. Assim, a principal característica de cada grupo seria a condição normal, melanoma não-metastático e melanoma metastático para MELC, PRIM e MET, respectivamente. Portanto, pela definição dos grupos e suas principais características, é possível observar que nosso grupo tem especial interesse por processos que conferem mais malignidade ao tumor, em especial processos que estejam associados à metástase – o nível mais grave e de difícil tratamento da maioria dos tumores.

3.2.2. Linhagens melanocíticas que compõem os grupos de progressão do melanoma e condições de cultivo

O grupo MELC são células que fazem parte deste grupo podem ser identificadas de acordo com as seguintes denominações: FM 308, MELC 80, MELC 124, MELC 125 e MELC 126. Estas células são linhagens primárias obtidas de prepúcio de pacientes sem displasia e que foram doadas para uso em pesquisa. Para isto, o projeto responsável pela coleta deste material, que é coordenado pela Profa. Dra. Silvy Stuchi Maria-Engler, passou por revisão e aprovação do Comitê de Ética do Hospital Universitário (HU- USP/SP) e está sob código de aprovação

HU nº CEP 943/09. Todas essas linhagens de melanócitos primários foram cultivados em meio 254CF (Thermo Fischer Scientific), suplementados com solução HMGS (Thermo Fischer Scientific), 200 µM de CaCl₂ e 2% de Soro Fetal Bovino inativado (SFB) (Gibco).

Os grupos PRIM e MET foram mantidas em 2 meios de cultivo diferentes de acordo com especificações próprias para cada uma delas. As linhagens celulares SK-MEL-147, SK-MEL-5, A375, SK-MEL-28 foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) e suplementado com 10% SFB (v/v). Já as linhagens celulares WM164, WM35, WM1552, WM902, WM278, WM793, WM9, WM1617, WM852 e 1205lu foram cultivadas em meio complexo TU (80% de meio de cultura MCDB-153, 20% de meio de cultura Leibovitz's L-15, 5µg/mL de Insulina e 1.6mM de CaCl₂) e foram suplementadas com 2% SFB (v/v) (Gibco).

3.2.3. Obtenção de linhagens celulares resistentes à Vemurafenib

As linhagens celulares de melanoma A375, SK-MEL-28 e WM164 foram utilizadas para a obtenção de linhagens celulares resistentes à droga Vemurafenib. De acordo com o banco de dados de linhagens celulares “Cellosaurus” (Bairoch, 2018), todas estas células são mutantes para o gene BRAF, sendo A375 e SK-MEL-28 mutantes homozigóticas e WM164 mutante heterozigótica. Assim, estas linhagens celulares carregam a mutação p.Val600Glu (c.1799T>A, ClinVar=VCV000013961). Neste trabalho, esta mutação é identificada como BRAFV600E para facilitar a compreensão dos dados e das análises.

As linhagens celulares originais foram denominadas “naive” e, destas, foram derivadas as células denominadas “resistant”, que possuem resistência à droga Vemurafenib (C₂₃H₁₈ClF₂N₃O₃S). O procedimento para obtenção de linhagens resistentes ao Vemurafenib ocorreu de acordo com o seguinte procedimento: células *naive* foram semeadas em uma densidade celular baixa (1 × 10⁴ células) em placas de 60 mm; em seguida, essas linhagens celulares foram tratadas com doses crescentes de Vemurafenib, com variação entre 0,5-6 µM, a cada três dias por um máximo de 6 semanas; além disso, as linhagens de células resistentes foram continuamente recarregadas com 6 µM de Vemurafenib a cada 2-3 dias. Este procedimento e a validação experimental ocorreu de acordo com Sandri *et al* (2016). Deste modo, também foi realizado *Western Blotting* de proteínas da via MAPK (A-RAF, B-RAF e C-

RAF) para confirmar a reativação desta via e, assim, foi confirmada a resistência molecular adquirida antes do uso das células resistentes (Faião-Flores et al., 2017; Sandri et al., 2016).

Todas as células melanocíticas foram mantidas em ambiente controlado, com atmosfera úmida, contendo 5% de CO₂ e temperatura de 37°C. Além disso, todas as linhagens celulares foram testadas para infecção por micoplasma regularmente.

3.2.4. Isolamento e preparo de RNA total

3.2.4.1. Extração de RNA e controle de qualidade

Para obtenção do RNA total das linhagens celulares, foi realizada a extração de RNA com o kit miRNeasy Mini Kit (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante. Como trata-se de extração com kit, a possibilidade de contaminação por DNA genômico é baixa (foi realizado o tratamento para eliminação de DNA em etapa posterior). Em seguida, foi realizada a quantificação e verificação da pureza do RNA total extraído em solução por meio da razão de comprimento de onda 260/280 nm e 260/230 nm em aparelho NanoDrop (Thermo Fischer Scientific). Todas as amostras utilizadas possuíam de razão próximos de 2, para ambas as análises. Assim, para verificar visualmente a qualidade do RNA extraído, foi realizado um experimento de eletroforese em gel de agarose não-desnaturante. Este método possui base na suposição de que a quantidade (e qualidade) de rRNA permitem inferir as mesmas características de todos RNAs de uma dada amostra. Isto é possível pois, em mamíferos, os rRNAs 28S e 18S possuem tamanho de ~5 kb e ~2 kb, respectivamente. Assim, a razão 28S:18S assumida como referência neste caso é de uma proporção de 2:1, e seria possível considerar que a população de RNA total estaria em sua maior parte integra. Para tal, foi coletado 200 ng de RNA total das amostras, misturado com 2 µL de corante azul de bromofenol e aplicado em poços de gel de agarose (1,5% v/p). Assim, foram observadas a presença de duas bandas correspondentes ao rRNA 28S e 18S, na razão acima mencionada, e uma pequena banda correspondente a fração de pequenos RNAs não-codificadores (maior parte sendo tRNAs) com pesos moleculares marcadamente inferiores.

3.2.4.2. Tratamento com DNase I e síntese de cDNA

O RNA total quantificado e que passou pelo controle de qualidade foi utilizado para conversão em cDNA que seria empregado em análises posteriores. Assim, foi utilizado 1 µg de RNA total para tratamento com RQ1 DNase I (Promega), de acordo com protocolos fornecidos pelo fabricante. Este tratamento é fundamental em ensaios de expressão genica por RT-qPCR para evitar possível contaminação com DNA genômico, seja por fita simples ou por fita dupla de DNA. Em seguida, foi realizada a síntese de cDNA com o kit de transcrição reversa High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems) conforme especificações estabelecidas pelo fabricante. O cDNA foi utilizado imediatamente para os experimentos seguintes ou armazenado em congelador (-20°C) para uso posterior.

3.2.5. Isolamento de frações nucleares e citoplasmáticas de linhagens celulares melanocíticas

Foi utilizado o kit Ambion PARIS (Life Technologies) para o isolamento de RNA da fração nuclear ou citoplasmática das linhagens celulares de melanoma. Por meio deste procedimento é possível isolar o RNA da fração total, nuclear ou citoplasmática, de acordo com a análise de interesse. Em resumo, as células de melanoma foram tripsinizadas e uma quantidade de 1×10^6 células foi sedimentado em um tubo 1,5 ml. Essas células foram submetidas ao fracionamento celular e centrifugadas à 4°C, sendo posteriormente coletadas as frações nucleares e citoplasmáticas. O sobrenadante foi realocado para outro tubo e o pellet permaneceu no mesmo tubo. Em seguida, cada lisado subcelular isolados e em tubos diferentes foram submetidos à ligação e lavagem em coluna. Deste modo, a fração do RNA nuclear e do RNA citoplasmático foi coletada em tubos diferentes e evitou-se contaminação cruzada. As etapas subsequentes incluíram tratamento com DNase, controle de qualidade de RNA, quantificação de RNA e produção de cDNA, como já mencionado para o isolamento de RNA total. Assim, foi possível utilizar o cDNA obtido do RNA de cada fração subcelular para análise da expressão gênica. Esta análise foi realizada por RT-qPCR para verificação do enriquecimento de genes de interesse em cada uma destas frações subcelulares. Como marcadores de enriquecimento nuclear ou citoplasmático, foram utilizados os lncRNAs NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) e DANCR (Differentiation Antagonizing Non-

Protein Coding RNA), respectivamente. Estes dois lncRNAs são amplamente conhecidos por possuírem expressão enriquecida em cada uma destas frações e por isso selecionados.

3.2.6. Análise dos níveis de expressão gênica utilizando RT-qPCR

Para análise dos níveis de expressão gênica, foi utilizada a metodologia de SYBR Green (Applied Biosystems), pelo seu baixo custo, qualidade e versatilidade. Para tal, foram desenhados *primers* específicos para cada gene (Tabela 3), e então os respectivos oligos foram obtidos de empresa comercial (Exxtend Oligos). Os *primers* foram desenhados utilizando o software online *Primer3* flanqueando regiões intrônicas e observando parâmetros ótimos de *design*. Estes *primers* customizados foram submetidos ao teste de eficiência (90% - 110%) e análise de curva padrão com as diluições de 1:5, 1:25, 1:125 e 1:625. Além disso, foram observadas as curvas de *melting* para evitar contaminantes genômicos, formação de dímeros de *primers* ou amplificação inespecífica.

Assim, para os ensaios de PCR em tempo real foi utilizado o kit SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) e este foi realizado em equipamento 7500 fast Real Time PCR System (Applied Biosystem). Todas as reações foram realizadas em triplicata e as amostras de cDNA que foram utilizadas estavam padronizadas para uma diluição na proporção 1:5. Os valores de expressão dos diferentes genes analisados foram normalizados e calibrados por um gene adequado à análise, e analisados pela fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$ para quantificação absoluta e obtenção do *fold change*, ou pela fórmula $2^{-\Delta C_t}$ quando somente eram normalizados por um gene controle interno, que não fornece quantificação absoluta e proporcional, mas permite a comparação do enriquecimento de cada gene com os controles conhecidos (Delás et al., 2019; Livak & Schmittgen, 2001). Os genes utilizados como controle endógenos foram SDHA (Succinate Dehydrogenase Complex Flavoprotein Subunit A), TBP (TATA-Box Binding Protein), NEAT1 (Nuclear Paraspeckle Assembly Transcript 1) e DANCR (Differentiation Antagonizing Non-Protein Coding RNA), de acordo com o ensaio de análise de expressão gênica realizado.

Tabela 3 - Sequências dos primers customizados para ensaios de RT-qPCR

Gene	Sequência de nucleotídeos
SDHA - Forward	5'- CCCGAGGTTTTCACTTCACTG-3'
SDHA - Reverse	5'- CCTACCACCACTGCATCAAA-3'
NEAT1 Forward	5'- GTGGAGGAGTCAGGAGGAAT -3'
NEAT1 Reverse:	5'- GCTAAGTTCAGTTCCACAAGACC -3'
DANCR Forward	5'- GCTCCAGGAGTTCGTCTCTT -3'
DANCR Reverse	5'- CAACAGGACATTCCAGCTTC -3'
U73166 Forward	5'- GCGGTCCTCATCTCTACCAT-3'
U73166 Reverse	5'- GTAATTCCAGACCCCTGTGG-3'
TBP Forward	5'- AGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3'
TBP Reverse	5'- TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'
PRAME-AS1 Forward	5'- CTCTAGGGGGATGGTCAGG-3'
PRAME-AS1 Reverse	5'- TTGTTTAATCCATCCAGTCTGTG -3'

3.2.7. Construção dos vetores de silenciamento

3.2.7.1. O vetor PLKO.1 para expressão de shRNAs (*short hairpin RNAs*)

Para silenciamento do lncRNA candidato foi escolhido o vetor de expressão de shRNAs PLKO.1 (Figura 2A). Este tipo de plasmídeo pode ser introduzido em células diretamente via transdução (para silenciamento transiente) ou ser convertido em partículas lentivirais para ser introduzido em célula alvo (para silenciamento constitutivo). Após a introdução na célula, este vetor permite seleção de células positivas por meio de um marcador de resistência à puromicina. Além disso, este vetor possui o promotor U6 humano que é transcrito pela RNA polimerase III. Após a inserção do shRNA no vetor, a ativação do promotor U6 irá dar origem aos shRNAs (Figura 2B).

Figura 2 – Mapa do vetor de expressão de shRNA PLKO.1 puro

Fonte: Addgene (2021)

3.2.7.2. Digestão enzimática e linearização do PLKO.1

Foi utilizado 6 µg de PLKO.1 para linearização e posterior inserção dos shRNAs de interesse. Assim, para digestão do vetor foram utilizadas as enzimas de restrição AgeI e EcoRI (New England Biolabs) de acordo com as instruções do fabricante. Esta reação de digestão teve volume total de 50 µl, duração de 2 h e temperatura constante de 37°C. Após o período de digestão, foi utilizado 1 µl dessa reação para corrida em eletroforese em gel de agarose 0,8 % (v/p) para verificar se a linearização foi positiva. Foram observadas duas bandas de tamanho aproximado de 7 kb e 1 kb referentes ao vetor linear e a sequência excisada da região de inserção dos shRNAs, respectivamente. Deste modo, foi confirmada a eficiência da digestão enzimática e a linearização do vetor. O restante da reação (49 µl) foi utilizado em nova corrida de eletroforese em agarose para separação dos fragmentos (7 kb e 1 kb), visualização e excisão do fragmento de interesse. Este fragmento foi purificado com o kit Wizard DNA Purification Kit (Promega) e quantificado em equipamento NanoDrop (Thermo Fischer Scientific).

3.2.7.3. Desenho de shRNAs para inserção em PLKO.1

Para a obtenção de shRNAs, foi utilizada a sequência FASTA que possui o melhor suporte, de acordo com o ENSEMBL GRCh38.p13 (ENST00000439898.1 - TSL:1 e GENCODE basic). Esta sequência foi submetida à ferramenta online de seleção de siRNAs do Instituto Whitehead (<http://sirna.wi.mit.edu/>). Assim, foi determinado um conjunto de siRNAs com escala de pontuação para o gene de interesse e os melhores ranqueados foram selecionados. O padrão de seleção dos siRNAs foi de acordo com Pei and Tuschl (2006) (N2[CG]N8[AUT]N8[AUT]N2) (Pei & Tuschl, 2006). Além disso, os critérios de filtro para a seleção dos siRNAs levaram em consideração: composição de GC entre 30% - 52% e exclusão de sequência possuindo quatro ou mais T, A ou G seguidos. Adicionalmente, o programa também possibilitou a utilização da Ferramenta Básica de Pesquisa de Alinhamento Local (BLAST) contra o banco de dados de genes do NCBI RefSeq para minimizar o silenciamento *off-target*. Após a seleção das sequências de siRNAs que atendiam aos requisitos citados, estas foram inseridas em um molde de oligonucleotídeo pré-determinado e que flanqueia as extremidades do vetor PLKO.1 (possuem extremidades coesivas para AgeI e EcoRI). Assim, foram obtidas as sequências de oligos senso e antisenso que foram encomendadas

comercialmente (Exxtend Oligos) para gerar os shRNAs (Figura 3). Foram desenhados 3 shRNAs (3 pares de siRNAs senso e antisense) de modo a ter como alvo diferentes regiões do lncRNA alvo.

Figura 3 - Esquema da produção da construção para expressão de shRNA

Fonte: Addgene (2021).

3.2.7.4. Pareamento dos oligos de shRNA e ligação ao vetor PLKO.1

Os oligos senso e antisense foram eluidos para 100 μ M e então foram submetidos à reação de pareamento. Para cada shRNA, foi preparada uma reação de pareamento utilizando-se 10 μ l de cada oligo (senso e antisense), 5 μ l do tampão NEB buffer 2 (New England Biolabs) e 25 μ l de água, totalizando uma reação com volume final de 50 μ l. Esta reação foi colocada em termociclador e submetida às seguintes condições: 95°C por 4 min, 70°C por 10 min e, em seguida, sofreu resfriamento lento até a temperatura ambiente e que durou até o final do dia. Em seguida, estes oligos de fita dupla foram purificados com Wizard DNA Purification Kit (Promega).

Para a realização da reação de ligação, foram utilizados os seguintes componentes: 2 μ l de oligos purificados, 3 μ l (20 ng) de PLKO.1, 1 μ l de T4 DNA ligase (Invitrogen), 2 μ l de 10x Buffer for T4 DNA ligase with 10 mM ATP (Invitrogen) e 12 μ l de água, totalizando 20 μ l de reação final. Esta reação foi mantida em termociclador à 16°C durante toda a noite.

3.2.8. Preparo de meio de cultura de bactérias

Previamente à utilização das bactérias, foi necessário produzir o meio de crescimento Luria-Bertani (LB) que estas utilizam para proliferação. Para cada 250 ml de meio LB líquido, foi utilizado 2,5 g de triptona (BD Biosciences), 1,25 g de extrato de levedura (BD Biosciences) e 2,5 g de NaCl (BD Biosciences). Para cada 250 ml de LB sólido, foram utilizados os mesmos compostos e a mesma quantidade do meio LB líquido, e foi adicionado 3,75g de bacto-ágar (BD Biosciences), permitindo assim a solidificação deste. Ambos os meios LB foram ajustados para o pH=7,5, autoclavados e posteriormente foram reservados para resfriamento à temperatura ambiente.

3.2.9. Preparo de bactérias competentes

Inicialmente foi necessária a expansão do estoque de bactérias competentes. Assim, foi utilizada uma alíquota (100 µL) de bactérias quimio-competentes *Escherichia coli* (DH5α) que estavam em estoque congelado em glicerol (-80°C) para o preparo de uma nova batelada. Para isso, foi retirado uma pequena fração da alíquota e esta foi amplamente espalhada em placa de Petri esteril (90x15 mm) contendo meio LB sólido e incubada durante a noite em estufa com temperatura de 37°C. No dia seguinte, foi isolada uma colônia única da placa utilizando-se uma ponteira “P10” e, então, esta foi dispensada em garrafa contendo 250ml de meio LB líquido. Esta garrafa foi incubada em plataforma agitadora com 250 RPM, em temperatura de 37°C, e mensurada por espectrofotometria a cada 20 min até atingir a densidade óptica $OD_{600} = 0,3$. Após atingir esse valor, a garrafa foi dividida em tubos de 50 ml e rapidamente resfriada em recipiente contendo gelo. Os tubos foram centrifugados em 8000 RPM por 5 min à 4°C. Em seguida, os *pellets* bacterianos de cada tubo foram re-suspendidos em 5 ml de solução de 60 mM de $CaCl_2$ previamente resfriado. Foram novamente submetidos a centrifugação e re-suspendidos em solução de $CaCl_2$, como descrito anteriormente. Para o preparo do estoque de bactérias competentes, o volume total foi re-suspendido em solução contendo 60 mM $CaCl_2$ e 20% de glicerol (v/v), e foi distribuído em alíquotas de 50 µL em tubos de micro-centrífuga de 1,5 mL.

É importante mencionar que todos estes procedimentos foram livres de antibióticos, e, por tal motivo, todas as medidas de assepsia necessárias foram adotadas, *e.g.* utilização de luvas, esterilização de materiais utilizados com etanol 70% e, quando possível, também esterilização em chama aberta. Além disso, toda a manipulação ocorreu em fluxo laminar estéril e de uso exclusivo para manipulação de culturas bacterianas.

3.2.10. Transformação de bactérias competentes

Para a etapa de transformação bacteriana, a técnica utilizada foi o choque térmico. Assim, foi adicionado 7 μL de produto de ligação (vetor plasmidial com inserto contendo shRNA), em alíquotas de 50 μL de bactérias competentes preparadas como descrito anteriormente, que foram homogeneizadas gentilmente e incubadas em gelo por 30 min. Em seguida, esta mistura foi submetida a temperatura de 42°C por 1 min e 45 seg, e rapidamente colocada em gelo novamente por mais 5 min. Após este choque térmico, as bactérias foram transferidas para um tubo de 15 mL para a etapa de recuperação. Neste tubo, havia o volume de 950 μL de meio LB líquido e estes foram incubados sob agitação de 250 RPM, em temperatura de 37°C por 1 h. Em seguida, o conteúdo foi transferido para tubos de 1,5 mL e centrifugados por 1 min em rotação máxima à temperatura ambiente. Então, foi descartado 800 μL de sobrenadante e o *pellet* bacteriano re-suspendido no restante do líquido. Este volume foi completamente espalhado em placa de Petri com LB sólido contendo ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) e incubado durante a noite em temperatura de 37°C para a seleção de transformantes positivos.

3.2.11. Minipreparação dos plasmídeos com protocolo de lise alcalina

Cada colônia de transformante positivo (*i.e.* aquelas colônias que cresceram na placa de Petri com ampicilina – descrito anteriormente) foi coletada, inoculada separadamente em tubos contendo 5 mL de meio LB líquido com ampicilina (100 $\mu\text{g/mL}$) e incubada em agitação de 250 RPM durante a noite e em temperatura de 37°C. No dia seguinte, os tubos foram centrifugados a 13500 RPM por 5 min e o sobrenadante foi descartado. Então, o *pellet* bacteriano foi re-suspendido utilizando-se para cada tubo 200 μL da solução de lise alcalina I (Glicose 50 mM, Tris-HCl 25 mM com pH=8 e EDTA 10 mM com pH 8,0), e permanecendo

em incubação por 5 min em temperatura ambiente. Em seguida, foi adicionado 200 μ L de solução de lise alcalina II (NaOH 0,2N e 1% SDS), ocorreu a homogeneização por inversão (cerca de 20 vezes) e incubação no gelo por 5 min. Transcorrido esse período, foi adicionado ao tubo mais 200 μ L da solução de lise alcalina III (acetato de potássio 6 M em ácido acético com pH 5,5) e esta foi novamente homogeneizada (cerca de 20 vezes) e mantida por 10 minutos no gelo. O próximo passo constou na centrifugação do tubo a 13500 RPM por 30 min, sendo posteriormente transferido o sobrenadante para novo tubo e descartado o precipitado. Para que houvesse a precipitação do DNA plasmidial, foi adicionado 480 μ L de isopropanol previamente resfriado e seguido de incubação por período de 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, ocorreu a centrifugação a 13500 RPM por 10 min, e ao precipitado resultante foi adicionado 500 μ L de etanol 70% previamente resfriado, e este foi centrifugado a 13500 RPM por mais 2 min. Após esta etapa, o sobrenadante foi descartado com muito cuidado com o precipitado e permitiu-se que este secasse à temperatura ambiente por 15 min. Então, este precipitado foi re-suspendido em solução tampão contendo 47,5 μ L TE (Tris-HCl 10mM e EDTA 0,1mM com pH 8,0) e 2,5 μ L de PureLink RNase A (20 mg/mL) e incubado por 10 min em 37°C. Por fim, o DNA plasmidial proveniente das minipreparações (minipreps) foi quantificado e sua pureza avaliada em espectrofotômetro por razão de comprimento de onda 260/280 nm em aparelho NanoDrop (Thermo Fischer Scientific). As minipreps foram estocadas em congelador (-20°C).

3.2.12. Seleção de clones e sequenciamento das minipreps

Cada uma das minipreps (1 μ g) foi analisada em uma corrida eletroforética em gel de agarose (1,5%) com a amostra controle (100 ng) – *i.e.* plasmídeo original (PLKO) sem o inserto. Aquelas minipreps que apresentaram padrão de banda similar no gel – seja similar à amostra controle ou entre si – foram considerados como membros de um mesmo grupo e apenas uma dessas amostras foi submetida ao sequenciamento. Assim, excluiu-se todas as amostras falso-positivas e evitou-se o sequenciamento desnecessário de amostras com mesmo perfil de bandas e que, potencialmente, poderiam apresentar o mesmo tipo de plasmídeo.

O sequenciamento de DNA das minipreps pelo método de *Sanger* foi utilizando o kit BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems). Assim, a reação foi preparada com 6 μ L de BigDye Terminator v3.1 Ready Reaction Mix, 2 μ L de 5X Sequencing Buffer, 0,5 μ L *primer* M13 Forward (Invitrogen) e 500 ng de DNA, totalizando 20 μ L de reação

após adição de água. As reações foram incubadas em termociclador Veriti 96-Well Thermal Cycler (Thermo Fischer Scientific) seguindo as condições: 1) 95°C por 1 min; 2) 95°C por 10 seg; 3) 60°C por 5 seg; e, 4) 60°C por 4 min, sendo que os passos 2-4 são repetidos por 24 vezes. Em seguida, essas amostras foram precipitadas e sequenciadas em sistema de sequenciamento capilar automático ABI 3500 XL (Applied Biosystems). Os cromatogramas gerados pelo sequenciamento foram analisados utilizando o software FinchTV versão 1.4.0 (Geospiza) para verificação da sequência exata e de possíveis alterações pontuais.

3.2.13. Produção de partículas lentivirais

Foram utilizadas linhagens celulares HEK293T para transfecção e produção lentiviral. Essas células foram plaqueadas em uma placa de 6 poços em baixa densidade até sua confluência em torno de 90%. Em seguida, foi utilizado 250 ng por poço de plasmídeo de envelope lentiviral pMD2.G (Addgene), 1,25 µg de plasmídeo de empacotamento psPAX2 (Addgene), 1,25 µg de cada construção e PEI MAX (Polysciences, Inc) em concentração de 1 mg/mL. Posteriormente, partículas lentivirais foram coletadas do meio de cultura e utilizadas para transfecção das células de melanoma. Em seguida, as células que foram transfectadas e que expressavam shRNAs contra lncRNA U73166 foram selecionadas com a utilização de 1 µg/mL de puromicina por pelo menos três dias. Para certificar que apenas células que expressavam os shRNAs, células não transfectadas foram usadas como controle e tratado com concentrações idênticas de puromicina durante o mesmo período. As células transfectadas com os dois shRNAs selecionados foram denominadas shU73166#1 e shU73166#3, e suas respectivas sequências de nucleotídeos estão representadas abaixo (Tabela 4). Além disso, foi utilizado como controle negativo o vetor pLKO.1 “original” ou “vazio” (shPLKO#NC), ou seja, o vetor sem a inserção dos oligos de silenciamento do lncRNA U73166.

Tabela 4 - Sequências de oligonucleotídeo utilizada para produção dos shRNAs

shRNA	Sequência de oligonucleotídeo
shU73166#1 <i>Forward</i>	5' – CCGGCCTGTCAATTCAGCCTTGTCTCGAGACAAGGCTGAATTGACAGGTTTTTG – 3'
shU73166#1 <i>Reverse</i>	5' – AATTCAAAAACCTGTCAATTCAGCCTTGTCTCGAGACAAGGCTGAATTGACAGG – 3'
shU73166#3 <i>Forward</i>	5' – CCGGCATTCATCAACCCTCAGGACTCGAGTCCTGAGGGTTGATGAATGTTTTTG – 3'
shU73166#3 <i>Reverse</i>	5' – AATTCAAAAACATTCATCAACCCTCAGGACTCGAGTCCTGAGGGTTGATGAATG – 3'

3.2.14. Ensaio de proliferação

Células da linhagem celular A375 foram semeadas a uma baixa densidade (5000 células/poço) em placas de cultura de 96 poços e que foram cultivadas em meio DMEM. A primeira medição (tempo = 0 h) foi realizada após 3 h do início do experimento para permitir que as células se fixassem no fundo dos poços. As seguintes medidas foram realizadas de acordo com o tempo de experimento contínuo: 24 h, 48 h, 72 h e 96 h. A partir de cada hora mencionada anteriormente, o meio DMEM foi removido das placas e as células foram fixadas com etanol a 70% durante 10 min à temperatura ambiente. Em seguida, o etanol foi removido e violeta de cristal (0,5%) foi adicionado e incubado à temperatura ambiente durante 15 min. Posteriormente, as células fixadas foram lavadas seis vezes com água e as placas ficaram reservadas até a completa secagem. Em seguida, 100 µl de ácido acético a 10% foi adicionado a cada poço e incubado por 30 min em temperatura ambiente. Finalmente, os valores de absorbância (540 nm) foi medido no leitor de placas FLUOstar Omega (BMG Labtech). Todos os experimentos foram realizados em 5 replicatas.

3.2.15. Ensaio de migração

As taxas de migração celular foram obtidas usando o Thincert Cell Culture Insert For 24 Well Plates (Greiner Bio-One). Resumidamente, um volume de 600 µL de suspensão de

células (1×10^4 células em suspensão) em meio sem soro DMEM foi adicionado às câmaras superiores dos insertos. Além disso, um volume de 600 μL de meio DMEM com 10% de SFB sem antibiótico foi adicionado na câmara inferior para induzir a migração celular. Após 24h de incubação, o meio foi removido e as células migradas foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com solução de violeta cristal 0,5%. As células que não migraram foram removidas do interior dos insertos com um cotonete de algodão, e cinco campos aleatórios foram fotografados com o sistema de microscópio invertido IX71 (Olympus). As imagens foram posteriormente processadas, quantificadas e analisadas usando o software ImageJ (Schindelin et al., 2012). Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.16. Ensaio de Invasão

As taxas de invasão de células foram obtidas usando o ensaio BioCoat Matrigel Invasion Chamber (Corning). Primeiramente, a câmara de invasão foi retirada do freezer e reidratada com meio DMEM a 37°C, conforme orientações do fabricante. Então, foi adicionado meio DMEM ao interior dos insertos e fundo dos poços 2 horas antes do início do experimento. Similarmente ao experimento de migração, um volume de 600 μL de suspensão de células (1×10^4 células em suspensão) em meio sem soro DMEM foi utilizado. Além disso, um volume de 600 μL de meio DMEM com 10% de SFB sem antibiótico foi adicionado na câmara inferior para induzir a invasão celular. Após 24 h de incubação, o meio foi removido e as células invasivas foram fixadas com paraformaldeído 4% e coradas com solução de violeta cristal 0,5%. As células não invasoras foram removidas do interior dos insertos com um cotonete de algodão, e cinco campos aleatórios foram fotografados com o sistema de microscópio invertido IX71 (Olympus). As imagens foram posteriormente processadas, quantificadas e analisadas usando o software ImageJ. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

3.2.17. Ensaio de *Wound Healing*

Células da linhagem celular A375 foram semeadas em placas de 6 poços a uma densidade de 5×10^4 células por poço e cultivadas por 6 h até atingirem aproximadamente 90% de confluência. Em seguida, a monocamada de células foi riscada suavemente usando a ponta

de uma micropipeta estéril de 200 μ L em um movimento contínuo. Cada poço foi lavado duas vezes com PBS 1X pré-aquecido a 37°C, e em seguida 5 ml de meio DMEM foram adicionados a cada poço. Todas as placas permaneceram em condições controladas de 37°C e 5% CO₂. As imagens de pontos específicos de cada poço foram obtidas nos tempos 0h, 24h e 48h. Foi utilizado o software ImageJ para processar as imagens adquiridas e realizar as análises quantitativas. A quantificação do fechamento da área relativa aberta é apresentada em unidades relativas. Os resultados representam a média de três medições de cada área ferida obtidas em três experimentos independentes.

4. RESULTADOS

4.1. Visão geral do conjunto de dados de RNA-Seq

Foi realizado o RNA-Seq de linhagens celulares melanocíticas (melanócitos $n = 1$, melanoma primário $n = 5$ e melanoma metastático $n = 3$), e posteriormente foi realizado o *download* de dados públicos brutos de diferentes linhagens celulares (melanócito $n = 1$, melanoma primário $n = 1$ e melanoma metastático $n = 6$). Esses dados foram então reunidos e submetidos ao mapeamento genômico. A eficiência de mapeamento das *reads* foi de 66,2% em média. Na Figura 4A é possível observar o número de *reads* que foram mapeadas e o número de genes respectivo de cada amostra no intervalo determinado. Para isto, foi considerado como um gene sendo expresso aqueles que apresentaram pelo menos cinco *reads* mapeadas, como considerado por outro estudo (Tarazona et al., 2011). Como esperado, foi detectado um menor número de lncRNAs expressos quando comparados com genes codificadores de proteínas no transcriptoma total para cada linhagem celular (Figura 4D).

Para facilitar a compreensão dos dados e análises, as células foram agrupadas nos seguintes grupos: melanócitos (MELC), melanoma primário (PRIM) e melanoma metastático (MET). Então, foram submetidos à análise de dados buscando transcritos exclusivos e comuns. O grupo que demonstrou maior número de genes exclusivos em linhagens celulares foi o grupo PRIM, com um total de 4276 genes, dos quais 1730 eram genes de lncRNAs. Os transcritos exclusivos do grupo MELC representaram um total de 433 genes, dos quais 184 eram genes de

lncRNAs. Além disso, os transcritos exclusivos do grupo MET representaram um total de 1255 genes, dos quais 490 eram genes de lncRNAs (Figura 4B e 4C).

O GENCODE possui uma classificação própria para os biótipos de lncRNAs e de modo geral tem relação com a localização dos genes codificadores de proteínas de *locus* adjacentes. Em nossa análise de dados, as duas categorias predominantes de biótipos em nosso conjunto de dados foram os genes do tipo *antisense* (n = 976) e *lincRNA* (n = 972). Embora tenham sido mais frequentemente detectados, a mediana do nível de expressão destas duas categorias de lncRNAs não foi maior que a mediana dos lncRNAs de outros biótipos (Figura 1E).

Figura 4 - Visão geral e análise dos dados do transcriptoma

Figura 1 – (a) Boxplot mostrando o número de genes detectados dentro de um intervalo regular de quatro *reads counts* no conjunto de dados do RNA-Seq. (b) Diagrama de Venn mostrando todos os genes que são expressos de modo exclusivos ou em comum em MELC (433 genes), PRIM (4276 genes) e MET (1255 genes). (c) Diagrama de Venn mostrando apenas lncRNAs com expressão compartilhada ou exclusiva em MELC (184 genes de lncRNAs), PRIM (1730 genes de lncRNAs) e MET (490 genes de lncRNAs). (d) Caracterização da fração do transcriptoma representando lncRNAs e os demais genes expressos em MELC, PRIM e MET. (e) Gráfico de *boxplot* mostrando os biótipos de lncRNAs encontrados nos grupos de melanoma de acordo com a classificação de GENCODE. As linhas no interior das caixas nos gráficos de *boxplot* representam a mediana. Fonte: Siena et al., 2019.

4.2. Expressão diferencial gênica entre linhagens celulares de melanócitos, linhagens celulares de melanoma primário e melanoma metastático

Para controle de qualidade dos dados e para verificar as disparidades das linhagens celulares, foi realizada a análise de componentes principais (PCA), que demonstrou estreita relação entre as linhagens melanocíticas e o grupo ao qual fazem parte. Ambas as linhagens celulares de melanócitos estavam bem distintas das demais linhagens celulares de melanoma primário e metastático (Figura 5a).

Em seguida, foram avaliados os genes diferencialmente expressos (DEG) nos diferentes grupos de progressão do melanoma (MEL, PRIM e MET). Assim, a análise comparando MELC x MET apresentou 593 genes diferencialmente expressos, dos quais 47 eram genes correspondentes à lncRNAs, incluindo 32 regulados positivamente e 15 regulados negativamente no melanoma metastático (Figura 5b, Tabela 5). Além disso, a comparação entre MELC x PRIM revelou 295 genes diferencialmente expressos, dos quais 29 eram genes de lncRNAs, incluindo 16 regulados positivamente e 13 regulados negativamente em linhagens celulares de melanoma primário (Figura 5c, Tabela 6). Por último, a comparação PRIM x MET apresentou 28 genes diferencialmente expressos, incluindo apenas 5 genes lncRNA, dos quais todos se apresentavam regulados negativamente no estágio metastático (Figura 5d, Tabela 7).

Adicionalmente, foi realizada a análise do padrão de expressão de DEGs por clusterização hierárquica não supervisionada. De tal modo, foi observado que os melanócitos sempre se agrupavam de maneira distinta das demais amostras de melanoma, tanto considerando-se todos os DEGs (Figura 5f) ou apenas o conjunto de lncRNAs DEGs (Figura 5e).

Figura 5 - PCA e genes diferencialmente expressos entre MELC, PRIM e MET.

Figura 3- **(a)** Gráfico de PCA mostrando as disparidades entre melanócitos e linhagens celulares de melanoma primário e metastático. Cada cor representa um grupo de progressão do melanoma e as diferentes formas representam diferentes experimentos das duas fontes de dados de RNA-Seq. **(b)** *Volcano plot* mostrando lncRNAs diferencialmente expressos entre MELC x MET, incluindo lncRNAs positivamente regulados (pontos vermelhos) e negativamente regulados (pontos verdes). **(c)** *Volcano plot* mostrando lncRNAs diferencialmente expressos entre MELC x PRIM, incluindo lncRNAs positivamente regulados (pontos vermelhos) e negativamente regulados (pontos verdes). **(d)** *Volcano plot* mostrando lncRNAs diferencialmente expressos entre PRIM x MET, mostrando apenas lncRNAs negativamente regulados (pontos verdes). **(e)** Clusterização hierárquica não-supervisionada usando distância euclidiana de todos os genes diferencialmente expressos **(f)** Clusterização hierárquica não-supervisionada usando distância euclidiana e considerando apenas genes de lncRNA diferencialmente expressos. Fonte: Siena et al. (2019).

A partir destes dados foram realizadas diferentes análises para os lncRNAs candidatos que foram encontrados diferencialmente expressos. Destaca-se que algumas dessas análises foram realizadas mais de uma vez para alguns lncRNAs, e outras foram realizadas de modo

exclusivo para determinado lncRNA. Notadamente, foram explorados mais profundamente os seguintes lncRNAs: ZEB1-AS1, U73166 e PRAME-AS1.

4.3. O lncRNA ZEB1-AS1 (ENSG00000237036)

4.3.1. O lncRNA ZEB1-AS1 está super-expresso em linhagens celulares de melanoma primário e metastático quando comparados com melanócitos

Para investigar mais detalhadamente os lncRNAs desregulados, foram selecionados os genes de lncRNAs com maior expressão em linhagens celulares de melanoma de acordo com seus valores de *Fold Change* (FC). Assim, foram priorizados os lncRNAs que estivessem desregulados nas comparações MELC x PRIM e MELC x MET, pois na comparação PRIM x MET só havia lncRNAs sub-expressos.

Deste modo, o lncRNA com a maior expressão diferencial positiva em ambas as comparações foi o lncRNA específico do melanoma SAMMSON (*Survival Associated Mitochondrial Melanoma Specific Oncogenic Non-Coding RNA*) (Tabelas 5 e 6). Este lncRNA foi amplamente caracterizado recentemente no melanoma tanto em ensaios *in vitro* quanto em experimentos *in vivo* (Leucci et al., 2016). Em segundo lugar, foi encontrado o lncRNA H19 (H19 Imprinted Maternally Expressed Transcript), que é conhecido um gene com expressão desregulada em câncer (Matouk et al., 2007; Raveh et al., 2015; K. Zhang et al., 2016), e está entre os lncRNAs mais diferencialmente expressos em nossas comparações (Tabelas 5 e 6). Em terceiro lugar, encontrava-se o lncRNA ZEB1-AS1 (*RNA antisense de ZEB1 1*), que está localizado na cadeia oposta de DNA do gene ZEB1 (*Zinc Finger E-box Binding Homeobox 1*). O ZEB1-AS1 estava entre os 6 principais genes na tabela de super-expressos em linhagens celulares de melanoma primário e metastático, em relação aos melanócitos. Assim, essa persistência de ZEB1-AS1 como um dos principais lncRNAs desregulados em diferentes comparações com melanócitos foi fator decisivo para considerar análises mais profundas. Além disso, é interessante o fato de que o gene ZEB1 (também encontrado com super-expressão em nossos dados) é conhecido por contribuir para o processo de Transição Epitélio-Mesenquimal (EMT) e progressão do câncer (Krebs et al., 2017; P. Zhang

et al., 2015). É importante ressaltar que nas linhagens celulares de melanoma que analisamos, existe uma forte correlação positiva entre os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e do mRNA ZEB1 (Figura 6).

Figura 6 – Correlação de Pearson entre a expressão do gene ZEB1 e do lncRNA ZEB1-AS1 nas linhagens celulares de melanócito, melanoma primário e metastático. Fonte: Siena et al. (2019).

4.3.2. Os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e ZEB1 estão positivamente correlacionados e associados com mutações frequentes em melanoma.

De acordo com dados de expressão de tecido normal disponíveis na base de dados do GTEx (GTEx Consortium, 2015; Lonsdale et al., 2013), é possível verificar que o ZEB1-AS1 é um lncRNA expresso em baixos níveis, de modo ubíquo e com um padrão de distribuição de tecido semelhante à expressão de ZEB1 (Figura 7 e 8). Em seguida, foi avaliada a expressão de ZEB1-AS1 em amostras de melanoma cutâneo (SKCM) disponibilizadas pelo consórcio TCGA. Foi verificado que a expressão de ZEB-AS1 possui uma forte correlação positiva com

o mRNA de ZEB1 em amostras de tumor primário (Figura 9a, $r = 0.66$ e $Pvalue < 0.001$) e melanoma metastático (Figura 9b, $r = 0.52$ e $Pvalue < 0.001$).

O melanoma foi o tumor que apresentou níveis mais baixos de expressão de ZEB1-AS1 em comparação a outros tumores (Figura 10). Contudo, em amostras de melanoma os níveis significativamente ($Pvalue < 0.0001$) mais altos de ZEB1-AS1 foram encontrados em metástases em comparação com melanomas primários (Figura 9c). Além disso, foi observado que amostras portadoras de mutações no gene BRAF ou genes da família do gene RAS apresentaram níveis significativamente maiores de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 quando comparadas ao grupo *Triple Wild Type* (Figura 9d). Comparativamente, o gene ZEB1 demonstrou maior níveis de expressão gênica apenas no grupo portador de mutações em BRAF quando comparado com *Triple Wild Type* (Figura 9e).

Figura 7 - Expressão do gene ZEB1 em tecidos normais

Figura 7 - Expressão do gene ZEB1 em 53 tipos de tecidos normais obtidos do consórcio GTEx. TPM = Transcripts Per Million. Fonte: Siena et al. (2019).

Figura 8 - Expressão do gene ZEB1-AS1 em tecidos normais

Figura 8 - Expressão do gene ZEB1-AS1 em 53 tipos de tecidos normais obtidos do consórcio GTEx. TPM = Transcripts Per Million. Fonte: Siena et al. (2019).

Figura 9 - Análise da expressão gênica do mRNA ZEB1 e do lncRNA ZEB1-AS1 em amostras de melanoma do TCGA

Figure 9 – Análise da expressão gênica do mRNA ZEB1 e do lncRNA ZEB1-AS1 em amostras de melanoma do TCGA. **(a)** Correlação significativamente elevada entre ZEB1 e ZEB1-AS1 em amostras de melanoma primário. **(b)** Correlação significativamente elevada entre ZEB1 e ZEB1-AS1 em amostras de melanoma metastático. Foi utilizado o teste do coeficiente de correlação de Pearson para esta análise. A faixa cinza representa o intervalo de confiança. **(c)** Análise do teste *T Student* mostrando a expressão significativamente maior de ZEB1-AS1 em melanoma metastático quando comparado a amostras de melanoma primário ($P\text{value} < 0.0001$). **(d, e)** ANOVA entre grupos separados de acordo com as principais mutações genômicas do melanoma demonstrando a expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e do mRNA ZEB1, respectivamente. $*$ $P \leq 0.05$, $**$ $P \leq 0.01$, $***$ $P \leq 0.001$, $****$ $P \leq 0.0001$. Fonte: Siena et al. (2019).

Figure 10 - Análise da expressão do lncRNA ZEB1-AS1 em 32 diferentes amostras tumorais do TCGA

Figure 10 - Análise da expressão do lncRNA ZEB1-AS1 em 32 diferentes amostras tumorais do TCGA. O gráfico de barras tracejadas destaca o ZEB1-AS1 em amostras de melanoma cutâneo (SKCM). ACC (*Adrenocortical carcinoma*), BLCA (*Bladder Urothelial Carcinoma*), BRCA (*Breast invasive carcinoma*), CESC (*Cervical squamous cell carcinoma and endocervical adenocarcinoma*), CHOL (*Cholangiocarcinoma*), COAD (*Colon adenocarcinoma*), DLBC (*Lymphoid Neoplasm Diffuse Large B-cell Lymphoma*), ESCA (*Esophageal carcinoma*), GBM (*Glioblastoma multiforme*), HNSC (*Head and Neck squamous cell carcinoma*), KICH (*Kidney Chromophobe*), KIRC (*Kidney renal clear cell carcinoma*), KIRP (*Kidney renal papillary cell carcinoma*), LGG (*Brain Lower Grade Glioma*), LIHC (*Liver hepatocellular carcinoma*), LUAD (*Lung adenocarcinoma*), LUSC (*Lung squamous cell carcinoma*), MESO (*Mesothelioma*), OV (*Ovarian serous cystadenocarcinoma*), PAAD (*Pancreatic adenocarcinoma*), PCPG (*Pheochromocytoma and Paraganglioma*), PRAD (*Prostate adenocarcinoma*), READ (*Rectum adenocarcinoma*), SARC (*Sarcoma*), STAD (*Stomach adenocarcinoma*), TGCT (*Testicular Germ Cell Tumors*), THCA (*Thyroid carcinoma*), THYM (*Thymoma*), UCEC (*Uterine Corpus Endometrial Carcinoma*), UCS (*Uterine Carcinosarcoma*), UVM (*Uveal Melanoma*). Fonte: Siena et al. (2019).

4.3.3. Associação entre a expressão do lncRNA ZEB1-AS1 com o fenótipo invasivo em melanoma

Tem sido proposto que, durante a progressão do tumor, as células do melanoma alternam entre um estado proliferativo e outro invasivo (F. Z. Li et al., 2015a). É importante ressaltar que para cada um destes estados fenotípicos já foram associadas assinaturas específicas de expressão gênica e que são inversamente correlacionadas (Widmer et al., 2012). Deste modo, utilizando-se a abordagem GSVA, e estas assinaturas que consideram genes “proliferativos” ou “invasivos” para o melanoma, foram estabelecidos os *scores* de enriquecimento. De tal modo, cada linhagem celular e cada uma das amostras de melanoma do consórcio TCGA puderam ser classificados para ambos os estados fenotípicos. Em seguida, foi avaliada a correlação entre os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 ou do mRNA ZEB1 e os *scores* proliferativos ou invasivos.

Os resultados revelaram que nas linhagens melanocíticas, a expressão de ZEB1-AS1 apresenta uma forte correlação positiva com o *score* invasivo (Figura 11b, $r = 0.67$ e $Pvalue = 0.0033$), além de ser inversamente correlacionada com o *score* proliferativo (Figura 11a, $r = -0.71$ e $Pvalue = 0.0013$). Resultados semelhantes foram observados para a expressão do gene ZEB1, com correlação positiva ainda mais alta com o *score* invasivo (Figura 8d, $r = 0.79$ e $Pvalue = 0.00019$) e maior correlação negativa com o *score* proliferativo (Figura 8c, $r = -0.82$ e $Pvalue = 5.1E-05$). É interessante notar que os melanócitos, que possuem os menores níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e do mRNA ZEB1, apresentaram o maior *score* proliferativo e menor *score* invasivo quando comparados com as linhagens de melanoma. Da mesma forma, no conjunto de dados do TCGA, as expressões do lncRNA ZEB1-AS1 e mRNA ZEB1 em amostras de melanoma primário e metastático encontram-se positivamente correlacionadas com o *score* invasivo e inversamente correlacionadas com o *score* proliferativo (Figura 11e-h).

Figura 11 – GSVA e associação de ZEB1 e ZEB1-AS1 com perfil invasivo em linhagens melanocíticas e amostras do TCGA

Figura 11 – (a, c). *Score plots* das linhagens celulares melanocíticas demonstrando a correlação significativamente - negativa dos níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e mRNA ZEB1 com o score proliferativo, respectivamente. (b, d). *Score plots* das linhagens celulares melanocíticas demonstrando correlação significativamente positiva dos níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e mRNA ZEB1 com score invasivo, respectivamente. (e, g) *Score plots* das amostras do TCGA demonstrando correlação significativamente negativa entre os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e mRNA ZEB1 com o score proliferativo, respectivamente. (f, h) *Score plots* das amostras do TCGA demonstrando correlação significativamente positiva entre os níveis de expressão do lncRNA ZEB1-AS1 e mRNA ZEB1 com score invasivo, respectivamente. A faixa cinza representada nos gráficos corresponde ao intervalo de confiança. FPKM: *Fragments per kilo base per million mapped reads*. CPM: *Counts per million*. Fonte: Siena et al. (2019).

4.3.4. Ontologia gênica e anotação funcional de genes co-expressos com ZEB1-AS1 em melanoma

Para obter *insights* sobre as vias biológicas que podem estar sendo reguladas pelo ZEB1-AS1 no melanoma, foram analisados os dados expressão dos genes positivamente ou negativamente correlacionados com a expressão de ZEB1-AS1 (genes co-expressos). Assim, a análise da correlação entre o lncRNA ZEB1-AS1 e demais genes usando dados do TCGA revelou 2059 genes positivamente co-expressos (PC, $r \geq 0.3$ e $Pvalue < 0.01$) e 116 genes negativamente co-expressos (NC, $r \leq -0.3$ e $Pvalue < 0.01$). Para efeitos de comparação, a mesma análise para o mRNA ZEB1 revelou 1617 genes positivamente co-expressos (PC, $r \geq 0.3$ e $Pvalue < 0.01$) e 242 genes negativamente co-expressos (NC, $r \leq -0.3$ e $Pvalue < 0.01$).

Utilizando a lista contendo os genes PC e NC com o lncRNA ZEB1-AS1, foi realizada a análise de enriquecimento funcional e de vias. Para os genes PC com ZEB-AS1, foi observado o enriquecimento total de 49 termos de Ontologia de Genes (GO) em processos biológicos (BP), 21 termos GO em componente celular (CC) e 25 em função molecular (MF). Por outro lado, os genes NC com ZEB1-AS1 demonstraram enriquecimento total de 31 termos de GO em processos biológicos, 7 termos de GO no componente celular e 27 termos de GO na função molecular. Em genes PC com ZEB1-AS1, foram encontrados termos GO mais enriquecidos em processos biológicos principalmente associados à transcrição de RNA e regulação da transcrição (Figura 12). Já para os genes NC com ZEB1-AS1, os termos GO melhor classificados no BP incluem transporte, processo metabólico e adesão célula-célula (Figura 12). Além disso, foi realizada a análise de enriquecimento das vias (*reactome*) que demonstrou o enriquecimento de genes PC com ZEB1-AS1 para *Spliceossomo*, transporte de RNA e a via de vigilância de mRNA. Por outro lado, o enriquecimento dos genes NC com ZEB1-AS1 ocorre principalmente para vias metabólicas, fagossomo e ciclo de vesículas sinápticas (Figura 12).

Figure 12 - Ontologia gênica e anotação funcional de genes co-expressos com ZEB1-AS1 em melanoma

Figura 12 – Análise de enriquecimento de GO e *Reactome* mostrando os 10 melhores termos GO classificados para genes correlacionados com o lncRNA ZEB1-AS1. Os gráficos de barras mostram o número de genes significativos para análise de enriquecimento funcional de componente celular, função molecular, processo biológico e de enriquecimento de vias *Reactome*, respectivamente. Barras vermelhas: genes correlacionados negativamente com ZEB1-AS1 (Pearson $r = <-0,03$). Barras azuis: genes correlacionados positivamente com ZEB1-AS1 (Pearson $r \geq 0,03$). Fonte: Siena et al. (2019).

4.4. O lncRNA U73166 (ENSG00000230454)

4.4.1. O novo lncRNA U73166 possui expressão desregulada em amostras de melanoma metastático quando comparado com melanócitos

Durante análise exploratória dos demais lncRNAs encontrados na análise da expressão diferencial realizada anteriormente, foi dada prioridade para encontrar novos lncRNAs que pudessem estar associados com processos mais agressivos do melanoma, como invasão ou metástase. Deste modo, a análise realizada na comparação entre MELC x MET apresentou um novo lncRNA com nenhuma citação na literatura científica (Tabela 5). Este novo lncRNA possui identificação no Ensembl como lncRNA U73166. Foi verificado que o lncRNA U73166 estava significativamente super-expresso em linhagens de células de melanoma metastático em comparação com melanócitos normais (*log fold change*: 4.32; *Adjusted Pvalue*: 0.038). Este lncRNA está localizado no cromossomo 3, em uma região entre os genes codificadores de proteínas SEMA3B (Semaphorin 3B) e GNAI2 (G Protein Subunit Alpha I2). Ainda de acordo com o Ensembl, a versão de transcrito com o melhor suporte para o lncRNA U73166 tem 2625 nucleotídeos de comprimento, e está distribuído em dois exons (Figura 13A).

Figure 13 - Contexto genômico do lncRNA U73166 e abordagem de silenciamento

Figure 13 – (A) Imagem obtida no navegador “UCSC genome browser” e que demonstra a localização do lncRNA U73166 e os genes codificadores de proteínas adjacentes. As linhas tracejadas indicam ampliação do transcrito e visa demonstrar que o lncRNA U73166 é composto por 2 exons. As linhas vermelhas ilustram as regiões que os shRNAs têm como alvo o transcrito lncRNA (shU1 = shU73166#1, shU2 = shU73166#2 e shU3 = shU73166#3).

As setas pretas indicam os primers customizados para experimentos de RT-qPCR (pF = primer *forward* e pR = primer *reverse*). **(B)** Eficiência de silenciamento mostrando que shRNAs projetados podem reduzir efetivamente os níveis de expressão do lncRNA U73166. TBP foi usado como um controle interno para normalização. O teste *T Student* foi realizado para comparar as diferenças entre os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizados em triplicata. **(C)** Sequenciamento Sanger de shU73166#1 e shU73166#3 demonstrando a orientação correta e a inserção dos shRNAs no plasmídeo PLKO.1. As áreas destacadas em azul e amarelo representam as sequências de *sense* e *antisense* de cada shRNA, respectivamente. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.2. Associação entre a expressão do gene lncRNA U73166 com fenótipo invasivo de melanoma

A análise GSVA que foi realizada para o gene ZEB1-AS1 também foi realizada como método investigativo para o novo lncRNA U73166. De tal modo, os resultados revelaram que este lncRNA demonstrou uma correlação positiva significativa com o *score* invasivo em linhagens celulares melanocíticas e amostras de melanoma do consórcio TCGA (Figura 14A e 14D, $r = 0.64$, $Pvalue = 0.0055$ and $r = 0.1$, $Pvalue = 0.031$, respectivamente). Além disso, o lncRNA U73166 é inversamente correlacionada com o *score* proliferativo em linhagens celulares melanocíticas e amostras de melanoma do consórcio TCGA (Figura 14B e 14E, $r = -0.56$, $Pvalue = 0.02$ and $r = -0.35$, $Pvalue = 3.1e-15$, respectivamente).

4.4.3. O lncRNA U73166 possui um padrão de expressão do tipo melanoma-testículo.

Decidimos investigar a expressão do lncRNA U73166 em uma plataforma de dados pública (Z. Tang et al., 2019), e notamos que sua expressão é maior no tecido de testículo normal, mesmo quando comparado com qualquer outro tecido normal ou tumoral. Decidimos verificar esses resultados experimentalmente, e testamos a expressão do gene lncRNA U73166 em diferentes linhagens de células melanocíticas e tecidos normais. De tal modo, foi possível confirmar que o lncRNA U73166 é mais expresso em tecido testicular normal quando comparado a outros tecidos humanos normais (Figura 14C). Curiosamente, também observamos que em linhagens celulares melanocíticas o lncRNA U73166 é altamente expresso em células de melanoma em comparação com melanócitos, sem qualquer tendência específica de enriquecimento para uma fase de progressão de melanoma particular (Figura 14F). Além disso, também analisamos a expressão do lncRNA U73166 em dados públicos do TCGA e não

detectamos diferenças entre diferentes subgrupos mutacionais de amostras baseados de melanoma ou entre amostras de melanoma primário e metastático (Figura 15).

Figura 14 - lncRNA U73166 GSVA de perfil invasivo/proliferativo e expressão gênica em tecidos normais e células melanocíticas

Figura 14 – (A) Correlação positiva entre a expressão do gene lncRNA U73166 e o *score* invasivo em linhagens celulares melanocíticas. (B) Correlação negativa entre a expressão do gene lncRNA U73166 e o *score* proliferativo em linhagens celulares melanocíticas. (C) Expressão gênica do lncRNA U73166 em diversos tecidos normais apresentando maior expressão em testículos. SDHA foi usado como controle interno e o método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para normalização e análise de dados. (D) Correlação positiva entre a expressão do gene lncRNA U73166 e o *score* invasivo em amostras de melanoma do consórcio TCGA. (E) Correlação negativa entre a expressão do lncRNA U73166 e o *score* proliferativo em amostras de melanoma do consórcio TCGA. (F) Expressão do lncRNA U73166 em melanócitos, linhagens celulares de melanoma primário e metastático. TBP foi usado como controle interno e o método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para normalização e análise de dados. Fonte: Siena et al. (2021)

Figura 15 – Análise da expressão do lncRNA U73166 em diferentes subgrupos de amostras de melanoma do TCGA

Figura 15 – Análise da expressão do lncRNA U73166 em diferentes subgrupos mutacionais e em amostras de melanoma primário e metastático provenientes do TCGA. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.4. O silenciamento do lncRNA U73166 demonstra associação deste transcrito com proliferação e invasão.

Com base na análise *in silico* anterior, demonstrando de associação positiva do lncRNA U73166 com a invasão e uma associação negativa com a proliferação, foi decidido testar experimentalmente se esses resultados seriam confirmados. Assim, foi realizado o silenciamento do lncRNA U73166 na linhagem celular de melanoma A375 usando a metodologia de *short hairpin* RNA (shRNA). Para isso, três shRNAs foram projetados e, dois destes (shU31766#1 e shU73166#3) foram usados visando o lncRNA U73166 em ensaios funcionais posteriores (Figura 13A e 13C). O shU31766#1 e shU73166#3 foram selecionados de acordo com a eficiência de silenciamento - 68% e 51%, respectivamente (Figura 13B) - e pela sua clonagem ter sido bem-sucedida e confirmada pelo sequenciamento Sanger (Figura 13C).

Nossos achados com análise bioinformáticas anteriores demonstraram significativa invasão associada à expressão do lncRNA U73166 e, após o silenciamento desse gene, foi verificado que essa capacidade de invasão estava significativamente reduzida (Figura 16A, 16B, 16D e 16E). Curiosamente, o fenótipo oposto avaliado, ou seja, a proliferação, não respondeu conforme os achados das análises bioinformáticas anteriores. Em vez disso, após 48 h do início do experimento, foram observadas taxas de proliferação significativamente maiores em controles do que em células silenciadas (Figura 16C e 16F), o que pode implicar que o lncRNA U73166 pode também interferir neste processo. Contudo, como nosso principal interesse de análise está relacionado à metástase, decidimos verificar se o lncRNA poderia impactar processos mais relacionados como a migração.

Figura 16 - Efeito do silenciamento do lncRNA U73166 na invasão e proliferação celular.

Figura 16 – (A) e (D) As amostras controle demonstraram um número significativamente maior de células invasivas do que as células com o lncRNA silenciado. O teste *t de Student* foi realizado para comparar as diferenças entre os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizadas em triplicata. (B) e (E) Imagens representativas que descrevem as diferenças encontradas e que a taxa de invasão das amostras controle foi mais pronunciada do que as células com o lncRNA U73166 silenciado. (C) e (F) Ensaio de proliferação mostrando que após 48 h amostras controle apresentaram maiores taxas de proliferação do que as células silenciadas. As imagens (A), (B) e (C) são do silenciamento utilizando o shU73166#1 e as imagens (D), (E) e (F) são de silenciamento utilizando o shRNAU73166#3. A análise estatística foi baseada no teste ANOVA. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.5. O silenciamento de lncRNA U73166 impacta a migração celular

Posteriormente, foi conduzida um experimento para avaliar se o lncRNA U73166 estava associado à migração. Usando o ensaio de migração do tipo *transwell*, foi possível verificar se as células possuíam habilidade de migrar através da membrana porosa. Foi observado que o número de células do grupo controle migrando era significativamente maior do que as células silenciadas (Figura 17A-E). Este resultado indica que a expressão do gene lncRNA U73166 também pode induzir a migração de células de melanoma. Assim, decidimos testar se os níveis de expressão reduzidos do lncRNA U73166 também poderiam influenciar a migração celular coletiva e, para isso, realizamos o ensaio de *wound healing* ("scratch"). Curiosamente, descobrimos que as células do grupo controle apresentaram taxas de migração mais altas do que as células em que o lncRNA U73166 estava com expressão silenciada (Figura 17). Este resultado indica que a migração coletiva de células de melanoma também pode ser afetada pela redução da expressão do lncRNA U73166. Portanto, podemos inferir que a expressão do gene

lncRNA U73166 pode impactar as células de melanoma em diferentes ensaios de migração celular.

Figura 17 - Efeito do silenciamento do lncRNA U73166 na migração celular pelo experimento *transwell*.

Figura 17 – (A) e (C) Quantificação de ensaios de migração mostrando número significativamente reduzido de células em migração após o silenciamento do lncRNA U73166. (B) e (D) Imagens representativas que ilustram as diferenças entre as condições em que a migração das amostras do grupo controle foi mais proeminente do que as células silenciadas. As imagens (A) e (B) são do silenciamento shU73166#1 e as imagens (C) e (D) são do silenciamento shU73166#3. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fonte: Siena et al. (2021).

Figura 18 - Efeito do silenciamento do lncRNA U73166 no ensaio de *wound healing*.

Figura 18 – (A) e (C) Imagens representativas que mostram uma diminuição na área aberta ao longo do tempo de modo mais acentuado em amostras de controle quando comparadas com células silenciadas. (B) e (D) Análise quantitativa da área relativa foi mais coberta por células do grupo controle do que células silenciadas. O teste *t de Student* foi realizado para comparar as diferenças entre os grupos experimentais. Os dados são apresentados como média $\pm$ DP de três experimentos independentes realizadas em triplicata. * $P \leq 0,05$, ** $P \leq 0,01$, *** $P \leq 0,001$. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.6. A análise da fração subcelular demonstra o enriquecimento nuclear do lncRNA U73166

É bem conhecido que muitos lncRNAs possuem expressões mais enriquecidas em determinados compartimentos subcelulares (Carlevaro-Fita & Johnson, 2019). Considerando esta informação, decidimos verificar se o lncRNA U73166 é enriquecido no compartimento citoplasmático ou nuclear. Esta análise foi realizada usando dados públicos derivados do projeto ENCODE e disponíveis em lncATLAS (Mas-Ponte et al., 2017). Assim, a maioria dos dados de linhagens celulares disponíveis demonstrou uma tendência clara de expressão do gene lncRNA U73166 em direção ao enriquecimento nuclear (Figura 19A). Curiosamente, a única linhagem celular representativa de melanoma (SKMEL5) neste conjunto de dados não apresentou nenhum resultado para o lncRNA U73166 (Figura 19A). Devido a esse resultado

intrigante, decidimos explorar essa falta de informação de modo experimental. Para isso, separamos e examinamos os compartimentos subcelulares da linhagem celular de melanoma A375, a fim de verificar a expressão para possível enriquecimento subcelular do lncRNA U73166. De tal modo, encontramos um alto enriquecimento do lncRNA U73166 na fração nuclear em comparação com a fração citoplasmática (Figura 19B e 19C). Surpreendentemente, nossos resultados demonstraram um enriquecimento maior do que o marcador enriquecido no núcleo lncRNA NEAT1 e que é comumente utilizado neste tipo de análise (Figura 19C). É essencial mencionar que utilizamos os mesmos lncRNAs marcadores de enriquecimento de compartimentos subcelulares que o banco de dados público (lncATLAS).

Figura 19 - Localização subcelular e enriquecimento do lncRNA U73166.

Figura 19 – (A) Gráfico obtido no lncATLAS mostrando enriquecimento da localização subcelular do lncRNA U73166 para diversas linhagens celulares (área destacada no centro), com dado ausente para a única linhagem celular de melanoma no conjunto de dados (SK-MEL-5). Os marcadores para comparação da localização subcelular são mostrados: no lado esquerdo, o marcador citoplasmático lncRNA DANCR, e no lado direito, o lncRNA NEAT1 com retenção nuclear. (B) Fração citoplasmática da linhagem celular A375 apresentando enriquecimento do marcador citoplasmático lncRNA DANCR, e escasso enriquecimento do marcador nuclear lncRNA NEAT1 e do lncRNA U73166. (C) Fração nuclear da linhagem celular A375 apresentando baixo enriquecimento do marcador citoplasmático lncRNA DANCR e altos níveis de enriquecimento do marcador nuclear lncRNA NEAT1 e do lncRNA U73166. O método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ foi utilizado para normalização e análise de dados. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.7. Linhagens celulares de melanoma e dados públicos indicam associação do lncRNA U73166 com resistência a Vemurafenib em mutantes BRAFV600E.

Para verificar se o lncRNA U73166 estaria associado à resistência contra Vemurafenib no melanoma, foram utilizadas três linhagens de células de melanoma que possuem a mutação BRAFV600E. Essas linhagens celulares originais (“*naïve*”) foram tratadas com concentrações crescentes de Vemurafenib para adquirir resistência ao fármaco e, em seguida, foram rotuladas como “resistentes”. Foi observado que as linhagens celulares resistentes expressam níveis significativamente mais elevados do lncRNA U73166 do que as linhagens celulares *naïve* (Figura 20A). Este resultado indica que as linhagens celulares que sofrem resistência ao Vemurafenib podem estar associadas aos níveis de transcrição do lncRNA U73166. Além disso, foi utilizado dados públicos de um paciente tratado com Vemurafenib e submetido à biópsia de melanoma antes e depois de adquirir resistência ao Vemurafenib e foi comparado com cinco pacientes diferentes com diferentes fármacos anti-melanoma. Os resultados mostraram que todos os cinco pacientes conduzidos com outros tratamentos não se correlacionaram com os níveis do lncRNA U73166 (Figura 20B). No entanto, o paciente tratado com Vemurafenib que adquiriu resistência apresentou expressão do gene lncRNA U73166 aproximadamente dez vezes maior do que antes (Figura 20C). Esses resultados podem sugerir uma possível correlação entre a resistência ao melanoma e níveis mais elevados de lncRNA U73166.

Figura 20 – Associação do lncRNA U73166 com resistência ao Vemurafenib em melanoma e RBP

Figura 20 – (A) RT-qPCR de três pares de linhagens celulares (*naïve* e resistente) mostrando maior *fold change* do lncRNA U73166 em linhagens celulares resistentes em comparação com células naïve. Os dados são apresentados como médias $\pm$ DP de três experimentos independentes realizadas em triplicata. (B) Cinco pacientes com melanoma tratados com uma combinação de Dabrafenib + Trametinib demonstraram níveis desiguais de expressão do lncRNA U73166. (C) Paciente que foi tratado apenas com Vemurafenib apresentou níveis dez vezes maiores de expressão do lncRNA U73166 após adquirir resistência ao fármaco. (D) Correlação positiva e significativa da expressão gênica entre HNRNPA2B1 e o lncRNA U73166. (E) Correlação positiva e significativa da expressão gênica entre SRSF1 e o lncRNA U73166. (F) Correlação positiva e significativa da expressão gênica entre RBFOX2 e o lncRNA U73166. Fonte: Siena et al. (2021).

4.4.8. O lncRNA U73166 interage com diversas proteínas e é um mediador potencial do processamento de RNA no câncer.

Para explorar ainda mais os resultados do lncRNA U73166 e obter informações sobre sua função na célula, decidimos verificar se existem proteínas interagindo com este transcrito. Para isto, foi utilizado dados públicos de CLIP-Seq, (J.-H. Li et al., 2014). Foram encontradas diversas proteínas de ligação ao RNA (RBP) que interagem diretamente com o lncRNA U73166

(Tabela 8). Essas RBPs foram classificadas e os 10 principais genes com melhor suporte (com pelo menos 4 experimentos de CLIP-Seq) foram selecionados. Dessa lista, analisamos a correlação positiva com a expressão do gene lncRNA U73166. Em seguida, separamos três genes com o maior coeficiente e significância. Notavelmente, HNRNPA2B1 ($R=0,3$ e $Pvalue = 9,2e-11$), SRSF1 ($R=0,28$ e $Pvalue = 9,3e-10$) e RBFOX2 ($R=0,27$ e $Pvalue = 3,3e-09$) demonstraram maior correlação e significância com a expressão do lncRNA U73166 (Figura 20D, 20E e 20F, respectivamente).

4.5. O lncRNA PRAME-AS1 (ENSG00000220891)

4.5.1. O novo lncRNA PRAME-AS1 possui expressão desregulada em amostras de melanoma primário quando comparado com melanócitos

Assim como os outros lncRNAs investigados mais profundamente neste estudo, o lncRNA PRAME-AS1 foi encontrado a partir da análise da expressão diferencial dos grupos de melanoma. Contudo, diferentemente de ZEB1-AS1 (desregulado em MELC x PRIM e também em MELC x MET) e U73166 (desregulado apenas em MELC x MET), o lncRNA PRAME-AS1 foi encontrado com expressão diferencial apenas na comparação MELC x PRIM (Figura 5 e Tabela 6). O lncRNA PRAME-AS1, tal como o ZEB1-AS1, chama atenção por ser um lncRNA do tipo antisenso de um importante gene (Figura 21). Especialmente neste caso, o gene em questão é o PRAME (Preferentially Expressed Antigen in Melanoma), muito conhecido por seu papel no melanoma.

Figura 21 – Contexto genômico do lncRNA PRAME-AS1

Figure 21 – O lncRNA está na fita oposta do gene PRAME, dividindo o TSS em uma disposição conhecida como “cabeça-com-cabeça”. É apresentado uma ampliação da região e um recorte com maiores detalhes da região de localização das sondas diferencialmente metiladas (caixa com bordas vermelhas). Informações obtidas de *UCSC Genome Browser*.

4.5.2. O lncRNA PRAME-AS1 possui padrão de expressão do tipo Cancer-Testis (CT)

Por meio da análise dos dados de expressão de tecido normal disponíveis na base de dados públicos do GTEx e dados públicos do TCGA foi possível observar que o lncRNA PRAME-AS1 é possui maior expressão em testículo e alguns outros tumores, incluindo melanoma (Figura 22A e 22B). Este padrão de expressão em tecido normal apenas em testículo e em outros tumores é conhecido como *Cancer-Testis*. Para confirmação deste padrão de expressão, foram realizados experimentos de RT-qPCR em diferentes tecidos normais (Figura 23A) e em linhagens celulares com diversificados *backgrounds* genéticos e pertencentes a diferentes fases de progressão do melanoma (Figura 23B). Nesta última análise, foi possível observar que em tecidos normais o PRAME-AS1 não foi nem detectado por meio da RT-qPCR na pele, o que pode indicar sua alta especificidade pela expressão em melanoma (tal como o mRNA PRAME).

Figura 22 – Gráfico obtidos no banco de dados GEPIA para tecidos normais e tumores

Figure 22 – **(A)** Gráfico “*Dot plot*” obtido pelo GEPIA2 demonstrando a expressão de cada amostra para os diferentes tumores (TCGA) e seus tecidos normais correspondentes (GTEx). Cada ponto representa uma amostra do respectivo tecido **(B)** Gráfico “*Bar plot*” obtido pelo GEPIA2 demonstrando a mediana de expressão do PRAME-AS1 para cada tipo de tumor ou tecido normal.

Figura 23 – Expressão do lncRNA PRAME-AS1 em tecidos normais e linhagens melanocíticas

Figura 23 – **(A)** Valores de expressão do lncRNA PRAME-AS1 obtidos por RT-qPCR em diversos tipos de tecidos normais apresentando maior expressão em testículos. SDHA foi usado como controle interno e o método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para normalização e análise dos dados. *não detectado pelo RT-qPCR. **(B)** Valores de expressão do lncRNA PRAME-AS1 obtidos por RT-qPCR em diversos tipos de linhagens melanocíticas. TBP foi usado como controle interno e o método $2^{-\Delta Ct}$ foi utilizado para normalização e análise dos dados. *não detectado pelo RT-qPCR. α e β representam linhagens celulares de uma mesma origem, em que células de melanoma metastáticas foram derivadas de células de melanoma primário.

4.5.3. O lncRNA PRAME-AS1 está positivamente correlacionado com o mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma primário

Além disso, a expressão de PRAME-AS1 mostrou uma significativa e alta correlação positiva com o mRNA PRAME em amostras de linhagens celulares de melanoma primário (Figura 24A, $r = 0.91$ e $Pvalue = 0.00097$), mas comparativamente em linhagens celulares de melanoma metastático perdeu nível de correlação e significância (Figura 24B, $r = 0.61$ e $Pvalue = 0.0789$). É importante ressaltar que a expressão deste lncRNA está diferencialmente expressa apenas entre MELC e PRIM, e nesta análise de correlação de Pearson a maior diferença de correlação e significância estatística estão presentes nas linhagens celulares representativas de melanoma primário.

Figure 24 – correlação do lncRNA PRAME-AS1 e mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma primário e metastático

Figura 24 – (A) Correlação dos valores de expressão normalizados (CPM – *Counts Per Milion*) entre lncRNA PRAME-AS1 e mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma primário. (B) Correlação dos valores de expressão normalizados (CPM – *Counts Per Milion*) entre lncRNA PRAME-AS1 e mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma metastático. r: índice de correlação de Pearson, p: *Pvalue*, IC: Intervalo de Confiança. O teste realizado foi correlação de Pearson “two-tailed” e *Pvalue* significativo foi considerado $p \leq 0,05$.

4.5.4. Análise de frações subcelulares do lncRNA PRAME-AS1 não demonstram presença restrita ao núcleo ou ao citoplasma

Foi realizada a análise da expressão subcelular do lncRNA PRAME-AS1, contudo esta não revelou diferenças entre expressão enriquecida no núcleo celular ou no citoplasma celular, o que pode indicar atuação em ambos os compartimentos (Figura 25).

Figure 25 – Análise do enriquecimento do lncRNA PRAME-AS1 em frações subcelulares

Figura 25 – Análise de enriquecimento do lncRNA PRAME-AS1 em frações subcelulares do núcleo e citoplasma.

4.5.5. Análise de dados públicos de metilação de DNA de linhagens melanocíticas

Foi realizado o download de dados públicos de metilação disponibilizados publicamente na plataforma GEO, sob o código de acesso GSE51547. Através da ferramenta COHCAP foram realizadas as seguintes etapas: (1) *input* de dados de metilação e alimentando o algoritmo com informações dos valores de metilação (valor β) das amostras utilizadas; (2) anotação dos dados, definindo localização cromossômica, gene de referência e ilha CpG (considerando anotações genômicas 450k-UCSC/hg19); (3) verificação da metilação diferencial por duas abordagens diferentes; e (4) análise de controle de qualidade dos dados obtidos (Figura 26), incluindo estatística descritiva. Assim, a sequência da análise com pacote COHCAP foi realizada por duas alternativas.

Figura 26 – Análise de controle de qualidade dos dados públicos de metilação das amostras melanocíticas

Figure 26 – (A) Dendrogram das amostras de melanócitos e melanoma representando o agrupamento hierárquico dos valores de metilação β . É apresentado o ID de cada amostra, sendo amostras de melanoma representadas em azul e os melanócitos são representados em vermelho. As amostras de melanócitos estão em duplicata técnica. (B) Gráfico de Análise de Componentes Principais (PCA). Neste caso, as amostras são plotadas com base em suas

coordenadas definidas pelos dois primeiros componentes principais, com possível definição de clusters de acordo com o grupo. As cores das mostras são determinadas com base no grupo de amostras (azul: melanoma; vermelho: melanócitos). (C) Histograma das amostras representando valores de densidade de metilação por amostra. É apresentada a distribuição da densidade das amostras e sua percentagem de metilação. Azul: melanoma; vermelho: melanócitos.

Em seguida, foi realizada a análise pelas médias dos sítios utilizando a função “COHCAP.avg.by.site”, que demonstrou 85 ilhas CpG diferencialmente metiladas (Tabela 9). Destas, foram encontradas 82 ilhas CpG que possuem metilação aumentada no melanoma e apenas 3 que possuem metilação diminuída no melanoma quando comparado com melanócitos. Desse total de 85 ilhas CpG, apenas uma estava associada à um lncRNA, identificado como *LOC648691*. O lncRNA derivado desta região diferencialmente metilada é do tipo antisense e se encontra na fita oposta do gene PRAME (Preferentially Expressed Antigen In Melanoma) (Figura 21A). Foi verificado que este lncRNA é o mesmo que havia sido identificado como diferencialmente expresso (super-expresso em PRIM quando comparado com MELC) em nossas análises, mas em nossos dados apresentava anotação diferente (*LL22NC03-63E9.3*). Deste modo, embora possuam anotações provenientes de fontes diferentes, estes dois termos *LOC648691* e *LL22NC03-63E9.3* se referem ao mesmo lncRNA, que para melhor entendimento neste trabalho foi simplesmente chamado de PRAME-AS1. Interessantemente, foi verificado que a análise da ilha CpG estava com metilação diminuída no melanoma. Notavelmente, na região genômica analisada (próxima a TSS), este lncRNA está com níveis altos de metilação em melanócitos e escassos níveis de metilação em amostras de melanoma (Figura 27)

Figure 27 – *Boxplot* de linhagens celulares de melanócitos e amostras de melanoma

Figure 27 – *Boxplot* de linhagens celulares de melanócitos (representados em verde) e amostras de melanoma (representados em amarelo). Os dados consideram ilhas CpG com até 3000 pb *upstream*. Observa-se níveis bastante distintos de metilação nos dois grupos, sendo que os melanócitos estão altamente metilados e amostras de melanoma apresentam baixos níveis de metilação.

Além da escassez observada de informações sobre lncRNAs nas análises, das 82 ilhas com metilação aumentada no melanoma, cerca de 25 ilhas CpG não possuíam informações sobre anotação gênica sendo referenciadas como “ilhas NAs”. Então, foi gerado um arquivo do tipo “BED” com as informações genômicas apenas para estas ilhas NAs (com intervalo correspondente a abrangência das sondas na ilha CpG). Assim, com o programa BEDTOOLS foram identificadas regiões adjacentes que poderiam comportar lncRNAs. Deste modo, foi possível identificar genes de lncRNAs que possam ser regulados por metilação de DNA em suas regiões promotoras (definidas como até 3000 pares de base *upstream* da região analisada). Portanto, foram identificados 7 lncRNAs: RP11-566K11.4, RP11-566K11.7, AP000282.2, RP11-649A16.1, RP11-175K6.1, CTD-2035E11.4 e CTD-2201E18.3. Similarmente, quando consideradas todas as 85 ilhas CpG identificadas, foram encontrados 18 lncRNAs: RP11-809C18.5, RASA3-IT1, RP11-122D10.1, LINC00925, RP11-566K11.4, RP11-566K11.7, RP11-961A15.1, RP11-589P10.5, RP11-589P10.7, AP000282.2, CTA-85E5.10, RP11-649A16.1, RP11-1336O20.2, RP11-175K6.1, CTD-2035E11.4, CTD-2201E18.3, AC006042.7 e CTD-2544N14.3. Contudo, nenhum destes correspondem à lncRNAs que haviam sido identificados como diferencialmente expressos previamente em nosso estudo.

A análise seguinte foi realizada com a função “COHCAP.avg.by.island”, que prioriza a análise pelas médias das ilhas CpG. Nesta situação, foram obtidas 196 ilhas diferencialmente metiladas (Figura 28), das quais, novamente, só o LOC648691 é representante da categoria de lncRNAs. Tal como a análise anterior, foram encontradas muitas ilhas CpG com ausência de anotação (ilhas NAs, $n = 60$), e por restrições do programa foi inviável identificar seus respectivos genes. Contudo, para sanar esse problema foi recuperada e utilizada a lista das sondas que correspondiam a essas 196 ilhas CpG para a re-anotação destas sondas. Deste modo, foi utilizado o pacote “FDb.InfiniumMethylation.hg19” para recuperar informações sobre cada uma dessas sondas de metilação. Através da função “getNearestTSS” foram identificados os sítios de início da transcrição (TSS) dos lncRNAs. Foram analisadas um total de 1907 sondas (figura 29), das quais 131 sondas estavam próximas a TSS de lncRNAs, e que correspondem a 83 lncRNAs únicos. Deste modo, foram identificados 4 lncRNAs que também possuem correspondentes com os DEGs lncRNAs (LINC00462, MCF2L-AS1, SATB2-AS1 e LL22NC03-63E9.3). Após re-anotação das sondas de metilação, o lncRNA PRAME-AS1 continua demonstrando metilação diferencial entre amostras de melanócitos e melanoma.

Figure 28 – *Heatmap* apresentando ilhas diferencialmente metiladas

Figure 28 – *Heatmap* apresentando ilhas diferencialmente metiladas ($n = 196$). As amostras são representadas pelas linhas horizontais e as ilhas pelas colunas. Há clusterização entre as amostras de melanócito (coluna verde) e de melanoma (coluna amarela) em seus respectivos grupos sem determinação da hierarquia. As amostras de melanócitos estão em duplicata técnica.

Figure 29 – *Heatmap* apresentando sondas diferencialmente metiladas

Figure 29 – *Heatmap* apresentando sondas diferencialmente metiladas (n = 1907). As amostras são representadas pelas linhas horizontais e as ilhas pelas colunas. Há Clusterização entre as amostras de melanócito (coluna verde) e de melanoma (coluna amarela) em seus respectivos grupos sem determinação da hierarquia. As amostras de melanócitos estão em duplicata técnica.

Para dar suporte aos dados verificados até o momento, foi utilizada o pacote “DMRcate”, e realizada a verificação análoga de regiões diferencialmente metiladas (DMRs). De modo similar ao pacote COHCAP, foram preparados os valores de intensidade de metilação (valor β), das amostras correspondentes aos grupos e as anotações para as ilhas CpG. Nesta ocasião, ao verificar se as DMRs possuíam relação com os lncRNAs diferencialmente expressos, foi observado um maior número de associações. Deste modo, foram identificados 10 lncRNAs DEGs relacionados às DMRs (AGAP2-AS1, FAM201A, LINC00462, LINC01010,

LL22NC03-63E9.3, MCF2L-AS1, RP11-284F21.9, RP4-665J23.1, SATB2-AS1 e ZMIZ1-AS1). Novamente, foi observada a presença e prevalência do lncRNA PRAME-AS1 como um lncRNA diferencialmente expresso e associado à uma região diferencialmente metilada.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, estudos de análises da expressão gênica e investigações sobre o transcriptoma não-codificador revelaram em diversos tipos de câncer que existem lncRNAs com expressão aberrante durante a progressão tumoral (Gibb et al., 2011; Huarte, 2015). Além disso, os lncRNAs apresentam níveis mais baixos de expressão e são mais tecido-específicos do que genes codificadores de proteínas, mesmo quando considera-se a expressão destes genes na carcinogênese (Derrien et al., 2012; H. Guo et al., 2016; S. Li et al., 2017). Em concordância com estes dados, neste estudo foi possível verificar que os lncRNAs produzem um padrão de expressão mais consistente de discriminação e capaz de discernir células de melanócitos de linhagens celulares de melanoma primário e metastático. Portanto, esses resultados podem permitir uma melhor maneira de diferenciar fenótipos normais de melanomas primários e metastáticos baseado somente na expressão específica de lncRNAs. Esses dados se demonstram especialmente importantes em vista da demanda cada vez maior por uma abordagem personalizada no tratamento do melanoma (Grzywa et al., 2017).

A análise da expressão diferencial de lncRNAs entre os grupos de melanoma permitiu escolher lncRNAs como candidatos para investigação mais aprofundada. Estes transcritos foram selecionados de modo que pudessem ser lncRNAs desregulados e representantes de cada um dos dois grupos de melanoma (primário e metastático) em comparação com os melanócitos. Deste modo, para a comparação MELC x PRIM foi considerado o lncRNA PRAME-AS1 e para a comparação MELC x MET foi considerado o lncRNA U73166. Além disso, foi considerado o lncRNA ZEB1-AS1 que estava diferencialmente expresso em ambas as comparações. É importante citar que também foram considerados os maiores valores de *Fold Change*, o *score* invasivo/proliferativo de GSVA e a relevância do gene codificador de proteína mais próximo para a escolha destes candidatos.

O lncRNA ZEB1-AS1 estava entre os 10 principais lncRNAs superexpressos em linhagens celulares de melanoma primárias e metastáticas em relação aos melanócitos. Além disso, seu valor de *fold change* estava também entre os maiores obtidos na expressão diferencial. Estudos anteriores já haviam relatado o envolvimento do lncRNA ZEB1-AS1 com outros tipos de câncer. Neste sentido, o aumento da expressão de ZEB1-AS1 foi relatado pela primeira vez no carcinoma hepatocelular e foi associado com prognóstico ruim, maior crescimento tumoral e metástase (T. Li et al., 2016). Curiosamente, estudos epigenéticos

demonstraram mecanismos de ação diferentes de indução da transcrição de ZEB1 por ação do lncRNA ZEB1-AS1 de acordo com o tipo de tumor. Liu e Lin (2016), sugeriram que o ZEB1-AS1 se liga e recruta diretamente a histona acetiltransferase p300 à região promotora do ZEB1, ativando a transcrição de ZEB1 e resultando em prognóstico ruim em osteosarcoma (C. Liu & Lin, 2016). Por outro lado, Su et al. (2017), demonstrou que no câncer de próstata o ZEB1-AS1 se liga e recruta MLL1 para a região promotora de ZEB1, induzindo a modificação H3K4me3 e, assim, ativando a transcrição do ZEB1 (Su et al., 2017).

Até o momento, o lncRNA ZEB1-AS1 não havia sido identificado ou associado ao melanoma, embora haja evidências significativas da influência do gene ZEB1 na EMT e no desenvolvimento do melanoma (Caramel et al., 2013; Wels et al., 2011). Neste sentido, já foi relatado que o melanoma apresenta fenômeno parecido com EMT na promoção de metástase, conhecido como *switching phenotype* (F. Z. Li et al., 2015b). Pela primeira vez, demonstramos a superexpressão do lncRNA ZEB1-AS1 em linhagens celulares de melanoma e relatamos uma expressão significativamente maior desse lncRNA em melanomas metastáticos em comparação com tumores primários. Além disso, confirmamos as expectativas prévias da expressão correlacionada positivamente entre ZEB1 e ZEB1-AS1 no melanoma, como já relatado anteriormente em outros tumores (T. Li et al., 2016; Lv et al., 2016; Su et al., 2017). Essa associação entre lncRNA ZEB1-AS1 e ZEB1 em melanoma é extremamente importante e permitirá que outros estudos possam ser desenvolvidos no futuro para desvendar o impacto funcional do lncRNA em melanoma.

Estudos com sequenciamento de próxima geração (NGS) identificaram mutações genéticas que fornecem informações sobre a heterogeneidade do melanoma, e que poderia ter implicações no prognóstico do paciente ou do tipo de terapia direcionada para tratamento do tumor (Berger et al., 2012; de Unamuno Bustos et al., 2017; Hodis et al., 2012). Nesse sentido, as amostras de melanoma do TCGA foram classificadas segundo as principais mutações encontradas no melanoma (Akbani et al., 2015), em subtipos NF1, RAS, BRAF e Triple Wild type (ausente de mutações em NF1, RAS e BRAF). Deste modo, essa classificação foi utilizada para análise com nossos dados e permitiu identificar maior expressão de ZEB1-AS1 nos grupos mutantes do gene BRAF e da família de genes RAS. Em relação ao impacto destas mutações, é conhecido que mudanças no microambiente tumoral podem influenciar o *switching phenotype*, podendo ter impacto nas células de melanoma que ainda não são invasivas. Deste modo, mutações no gene BRAF ou NRAS, aliados ao silenciamento ou deleção de PTEN, podem influenciar células de melanoma para ativação de sinais de sobrevivência e proliferação

(Hoek & Goding, 2010; Ossowski & Aguirre-Ghiso, 2010). Além disso, como ambos os genes são encontrados na via MAPK, estes achados e a interação com ZEB1 podem sugerir um papel chave do lncRNA ZEB1-AS1 nesta via regulatória (Akbani et al., 2015). De fato, um estudo recente sugeriu que a resistência aos inibidores de MAPK no melanoma pode ser devido à plasticidade celular mediada por altos níveis de expressão do gene ZEB1 (Richard et al., 2016).

Embora o papel do ZEB1 na promoção da invasão e progressão maligna em muitos tumores esteja bem estabelecida (Larsen et al., 2016; Sanchez-Tillo et al., 2013; P. Zhang et al., 2015), a sua associação com capacidade de invasão e progressão tumoral ainda é escassa. Para abordar tal questão em melanoma, foi utilizada assinaturas gênicas bem estabelecidas e associadas ao fenótipo invasivo ou proliferativo de melanomas (Widmer et al., 2012). Assim, foi possível estabelecer *scores* para cada um desses dois fenótipos e demonstrar uma correlação entre níveis mais altos de ZEB1-AS1 e o perfil invasivo em linhagens celulares de melanoma. É importante ressaltar que os melanócitos demonstraram um *score* de associação inverso, com maior *score* associado à proliferação e menor *score* associado ao perfil invasivo. É importante mencionar que os melanócitos possuem fatores de transcrição específicos e fundamentais para a diferenciação e desenvolvimento. Nesse sentido, o papel crucial do gene MITF (*Melanogenesis Associated Transcription Factor*), além de determinar o destino dos melanócitos embrionários, inclui a regulação dos genes *downstream* envolvidos na progressão do ciclo celular, como o gene CDK2 (Du et al., 2004) e outros indutores da proliferação celular, como o gene DIAPH1 (Carreira et al., 2006). De fato, sugere-se que o potencial regulatório do gene MITF em níveis normais (endógenos) estimule a proliferação, enquanto a sua diminuição ou superexpressão possam inibir a competência relacionada à proliferação celular (Kido et al., 2009).

Além disso, foi realizada análise de genes que pudessem estar co-expressos e que pudessem apresentar potencial de impacto biológico quando associados à expressão do lncRNA ZEB1-AS1. Assim, genes correlacionados positivamente e negativamente foram submetidos ao enriquecimento de vias e anotação funcional (Ontologia Gênica – GO). Nos genes positivamente correlacionados, os principais termos GO encontrados para processos biológicos demonstrou principal associação com a transcrição do RNA e regulação da transcrição. Dentro dessa análise, foi encontrado como positivamente correlacionado o fator de transcrição MZF1 (*Myeloid Zinc Finger 1*). Esse gene é bastante conhecido por contribuir para malignidade e invasão em muitos tumores (Eguchi et al., 2015). De fato, tem sido recentemente associado à regulação positiva do gene PRAME (*Preferentially Expressed Antigen in Melanoma*) e à

formação de colônias, que estão associadas com potenciais metastáticos em linhagens celulares de melanoma (Y.-K. Lee et al., 2017). Os genes correlacionados negativamente em processos biológicos estão associados principalmente à processos metabólicos de transporte. Neste sentido, a presença do gene ASNA1 (*Arsa Arsenite Transporter, ATP-Binding, Homolog 1*) nesta correlação, por exemplo, indica potencial anti-neoplásico pois este gene já foi associado com aumento da susceptibilidade celular à drogas anti-tumorais (Hemmingsson et al., 2009).

O trabalho de Widmer et al. (2012) utilizou dados de expressão gênica obtidas por micro-arranjo e conseguiu estabelecer uma assinatura de invasão e outra de proliferação (Widmer et al., 2012). Estas duas assinaturas são compostas por genes cuja expressão gênica é inversamente proporcional à outra assinatura em amostras de melanoma. Ou seja, um gene que foi escolhido para o perfil proliferativo possui alto valor de expressão em amostras proliferativas e, necessariamente, possui baixo valor de expressão para amostras invasivas, e vice-versa. Assim, estas assinaturas poderiam ser utilizadas para definir se determinada amostra de melanoma possui *status* proliferativo ou invasivo, de acordo com os valores de expressão que estas apresentem para os genes das respectivas assinaturas.

Utilizando as assinaturas provenientes do trabalho de Widmer et al. (2012)(Widmer et al., 2012) e GSVA foi possível analisar os valores de expressão dos genes dessas assinaturas combinados com a expressão de um determinado lncRNA e definir um *score* proliferativo ou invasivo para as amostras melanocíticas. Neste sentido, foi priorizado o novo lncRNA U73166 que, até onde sabemos, nunca foi investigado ou mencionado na literatura científica até o momento. O lncRNA U73166 está diferencialmente expresso entre MELC x MET e apresentou associação positiva com *score* invasivo e negativa com *score* proliferativo. Pelo fato de possuir associação positiva com invasão e se tratar de um gene desregulado apenas em MELC x MET o lncRNA U73166 foi selecionado para análises posteriores.

A invasão de células tumorais para tecidos adjacentes é um importante processo da carcinogênese e malignidade tumoral. É provável que as células neoplásicas tenham parte dessas habilidades intrínsecas, embora o grau e o tempo de invasão e metástase possam variar por conta da genética e epigenética tumoral (Jiang et al., 2015). Em relação ao melanoma, este é um processo de transição crucial de melanócitos hiperplásicos para o melanoma grave (Gaggioli & Sahai, 2007). Esta característica natural invasiva se dá principalmente pela origem embrionária das células de melanoma provenientes da crista neural, e está envolvida com diversos vias específicas de sinalização dessa linhagem como TGF β e WNT (Arozarena & Wellbrock, 2017).

Os lncRNAs são capazes de interagir com diversas biomoléculas e assim participar ativamente de importantes vias que estão desreguladas no câncer, inclusive na motilidade e invasão (Schmitt & Chang, 2016). De fato, o lncRNA HOTAIR, um dos mais conhecidos e estudados lncRNAs até o momento, foi uma das descobertas mais impactantes pela associação com invasão e metástase em câncer (R. A. Gupta et al., 2010).

Na última década, o número de lncRNAs associados com a invasão de melanoma tem aumentado substancialmente, evidenciando a importância destes transcritos neste processo. Contudo, este campo de pesquisa acabou de surgir e ainda é pouco explorado. Para conhecimento, uma pesquisa no banco de dados do PUBMED com os termos “*lncRNAs AND invasion AND melanoma*”, considerando somente o último ano, retorna 34 diferentes artigos abordando o tema (acesso em 21/01/2021). Portanto, a identificação do novo lncRNA U73166, que apresentou expressão diferencial em linhagens metastáticas de melanoma quando comparado com melanócitos, e sua relação com invasão na análise GSVa foi um ponto crucial para decidir investigar mais este lncRNA.

Deste modo, foi decidido verificar se os dados obtidos nas análises bioinformáticas poderiam ser confirmados experimentalmente. Assim, foi realizada a análise da expressão do lncRNA U73166 em tecidos normais e linhagens melanocíticas por RT-qPCR. Foi observado que a expressão do lncRNA U73166 é presente em maiores níveis de expressão em tecido de testículo normal quando comparado com outros tecidos normais; e maiores níveis de expressão em linhagens de melanoma (primário e metastático) quando comparado com melanócitos. Este tipo de expressão é particularmente interessante, pois confirma o padrão de expressão aumentado em melanoma quando comparado com melanócitos. Embora não seja ausente a expressão em melanoma primário, isso pode significar que as células já apresentam expressão do lncRNA U73166 e que outros fatores intrínsecos da metástase possam afetar o agravamento e relação com a expressão deste lncRNA.

Tendo em vista os achados até o momento, foi decidido investigar funcionalmente o lncRNA U73166 por meio do silenciamento utilizando a metodologia de shRNAs. Nossos resultados demonstraram que as células de melanoma foram significativamente impactadas em seu potencial invasivo após o silenciamento do lncRNA U73166 e apresentaram níveis reduzidos de invasão. Esse dado está em concordância com nossos resultados obtidos em GSVa e o *score* invasivo positivamente correlacionado com o aumento do valor de expressão do lncRNA U73166. Assim, foi possível confirmar que com maior expressão do lncRNA U73166

as células de melanoma possuem maior capacidade de invasão e com o silenciamento do lncRNA há queda nas taxas invasivas.

Para a análise complementar dos resultados obtidos em GSVA para o lncRNA U73166 foi realizado o experimento de proliferação. Surpreendentemente, o lncRNA U73166, que estava negativamente correlacionado com o perfil proliferativo em GSVA, apresentou associação com a taxa proliferativa experimentalmente. Deste modo, as células de melanoma que foram silenciadas apresentaram queda nas taxas de proliferação em comparação com as amostras do grupo controles. Essas disparidades entre os resultados dos experimentos de proliferação versus análise de bioinformática podem refletir peculiaridades das diferentes linhagens celulares utilizadas e também referentes aos dados de amostras do TCGA utilizadas. Portanto, foi decidido investigar aspectos mais relacionados à metástase e maior agressividade do tumor como a migração.

Para verificar o impacto do lncRNA na migração foi determinado o uso de 2 tipos de experimentos: ensaio de migração de células com uso de insertos (“células únicas”) e ensaio de *wound healing* ou *scratch assay* (migração celular coletiva). Para o ensaio de migração com insertos, foi verificada uma alta taxa de migração celular no grupo controle quando comparado com o grupo em que o lncRNA U73166 estava silenciado. Assim, demonstrando que a expressão do lncRNA U73166 está associado à migração de “células isoladas” através da membrana do inserto. Da mesma forma, no experimento de *wound healing* foi observado a redução significativa na migração das células em que o lncRNA U73166 estava silenciado. Tal resultado demonstra que a habilidade de migração coletiva que as células de melanoma possuem é influenciada pela diminuição dos níveis de expressão do lncRNA U73166.

Deste modo, como a expressão do lncRNA U73166 positivamente associada com invasão (suportado pelos dados de bioinformática), migração e invasão (suportada experimentalmente), nossos resultados sugerem um papel do lncRNA U73166 no fenótipo invasivo e migratório do melanoma. Contudo, as disparidades entre os resultados dos experimentos de proliferação experimental comparada com a análise de bioinformática podem refletir peculiaridades das diferentes linhagens celulares e amostras do TCGA que foram utilizadas. De tal modo, a linhagem celular de melanoma A375 usada neste estudo não compreende todos os diferentes aspectos que outras amostras de melanoma podem ter, como mutações específicas (diferentes de BRAFV600E) ou diferentes locais para quais podem metastatizar (para linhagens celulares metastáticas). Além disso, é possível observar que a proliferação apresenta diferenças significativas apenas 48h após o início do experimento, e o experimento *wound healing* foi

conduzido durante apenas 48h. Essa diferença pode significar que, quando sincronizadas, as linhagens celulares silenciadas podem apresentar um fenótipo invasivo robusto nas primeiras horas e, em seguida, mudar para um perfil mais proliferativo.

Como explicado anteriormente, a mutação BRAFV600E está presente em aproximadamente 50% dos casos de melanoma e ativa constitutivamente a via MAPK/ERK. Embora alguns medicamentos visem essa alteração como o Vemurafenib, o tratamento logo falha porque as células adquirem resistência, principalmente mudando para ativação de CRAF e ARAF. Assim, entender como a resistência atua e como pode ser direcionada esta questão se mostra um passo essencial no avanço do tratamento de melanoma. Visando esse ponto, com a utilização de linhagens celulares de melanoma que possuem a mutação BRAFV600E, foi possível mostrar que o lncRNA U73166 pode ter um papel fundamental na resistência ao Vemurafenib. Isto foi possível ao analisar o experimento de RT-qPCR em que os níveis de expressão do lncRNA U73166 estavam mais elevados em células resistentes à Vemurafenib quando comparadas às células não-resistentes pareadas. Similarmente, a análise de amostras originadas de biópsias de paciente antes e depois de adquirir a resistência à Vemurafenib demonstraram níveis mais elevados de expressão do lncRNA U73166, cerca de 10 vezes mais, no melanoma quando o paciente adquiriu resistência ao Vemurafenib.

Cada vez mais nos últimos anos surgem evidências de ncRNAs com expressão específica e de modo desregulado que demonstraram ter um papel diagnóstico ou prognóstico no melanoma e resistência aos fármacos (Riefolo et al., 2019). Em relação aos lncRNAs e seu papel na resistência, é importante ressaltar que alguns destes lncRNAs possuem expressão restrita ao melanoma como por exemplo o lncRNA RMEL3 (Goedert et al., 2016) ou o lncRNA SAMMSON (Leucci et al., 2016). É importante ressaltar que o silenciamento do lncRNA SAMMSON inibiu o crescimento de células de melanoma invasivo e potencializou o efeito de inibidores de BRAF e MEK em células que adquiriram resistência ao melanoma, demonstrando assim a utilidade como alvo terapêutico no tratamento do melanoma (Dalay, 2016; Goding, 2016; Leucci et al., 2016)

Por meio da análise das frações subcelulares é possível ter um indício importante dos locais de ação em que os lncRNAs podem estar. Nossos dados revelaram maior enriquecimento de lncRNA U73166 na fração nuclear do que na fração citoplasmática. Esse enriquecimento indicaria que ele poderia atuar no nível transcricional ou em outros eventos nucleares relevantes. Assim, foi decidido realizar uma análise no banco de dados público de interações lncRNA-proteína que possui dados de CLIP-seq. Essa análise nos permitiu recuperar proteínas

que interagem diretamente com o lncRNA U73166 e foi observado que muitas delas atuam no processamento de RNA e eventos de *splicing*. Algumas dessas proteínas encontradas foram reveladas como importantes na migração, invasão, transição epitelial-mesenquimal (EMT), metástase e associadas a outros lncRNAs em outros tipos de câncer (Dai et al., 2017; A. Gupta et al., 2020; Y. Liu et al., 2020; Shen et al., 2021; Yu et al., 2018). É bem conhecido que no compartimento nuclear os lncRNAs podem atuar como um *scaffold* e estar associados a proteínas no processo de regulação gênica. Portanto, potenciais parceiros de proteína interagindo com lncRNA U73166 foram investigados e HNRNPA2B1, SRSF1 e RBFOX2 demonstraram uma expressão de correlação positiva robusta com lncRNA U73166. Embora informações insuficientes sobre melanoma tenham sido encontradas na literatura, descobrimos que RBFOX2 e HNRNPA2B1 foram estabelecidos para regular o desenvolvimento do tumor - principalmente por meio de processos relacionados à EMT - e no câncer pancreático, o HNRNPA2B1 atua através da via ERK (Braeutigam et al., 2014). É essencial mencionar que ERK1/2 são reguladores críticos da via de sinalização MAPK e estão sob ativação dos genes A/B/C-RAF (Y. Guo et al., 2020). Portanto, a interação direta entre o lncRNA U73166 e esses RBPs e a correlação positiva podem indicar a associação regulatória na expressão gênica dessas moléculas. Contudo, estes achados requerem uma investigação mais aprofundada.

Em relação à regulação epigenética, é bastante conhecido o efeito da metilação do DNA e sua influência na regulação da expressão gênica (Holliday & Pugh, 1975). Além disso, cerca de três décadas atrás, surgiram suspeitas de que alterações no padrão de metilação poderiam ter impacto no fenótipo do câncer (Feinberg, 2014). Nesse sentido, já foi demonstrada a presença de hipermetilação de genes supressores de tumor e desenvolvimento do câncer (Greger et al., 1989). Entretanto, dados mais recentes sugerem que parte do silenciamento epigenético é resultado de alterações já existentes na cromatina de genes silenciados em tecidos normais, e dos quais o câncer pode surgir (Sproul et al., 2012).

Para os lncRNAs, existem diversos estudos que demonstraram a abrangente capacidade de regulação da expressão gênica e especificidade tecidual controladas por mecanismos epigenéticos (Amin et al., 2015; Guttman et al., 2009; S. C. Wu et al., 2010). Contudo, essas alterações epigenéticas relacionadas à expressão de genes de lncRNAs e seu envolvimento com a progressão de tumores ainda é pouco estudada. Esta é uma tarefa desafiadora devido à problemas decorrentes de anotação e dificuldades técnicas para detectar alterações epigenéticas e a relação com a expressão gênica. Porém, recentemente houve o aparecimento de alternativas que se demonstraram bastante promissoras neste sentido (Z. Wang et al., 2018). Com base

nesses recentes avanços, e em posse dos dados de RNA-Seq dos lncRNAs em linhagens melanocíticas foi decidido investigar a relação entre lncRNAs diferencialmente expressos e mecanismos epigenéticos, i.e., metilação de DNA. Com a obtenção de dados públicos de *array* de metilação para grupos similares ao da análise de RNA-Seq foi possível buscar uma resposta para essa questão.

É comum associar a metilação de DNA à ativação/repressão de genes durante processos biológicos e a progressão do câncer. A partir dessa premissa, foi gerada a hipótese de que seria possível que alguns lncRNAs, já identificados neste estudo como genes diferencialmente expressos, pudessem também estar associados a regiões diferencialmente metiladas (DMRs). Para testar essa hipótese, foi realizado o download de dados de metilação disponibilizados publicamente na plataforma GEO. Deste modo, considerando as dificuldades mencionadas, foi identificado o lncRNA LL22NC03-63E9.3/LOC648691 (nomeado aqui como PRAME-AS1) com níveis de metilação da TSS (*Transcription Start Site*) inversamente correlacionado com a expressão gênica e aparentemente associado à progressão do melanoma. Assim, quando a expressão deste lncRNA nos melanócitos é baixa, é possível observar que a o TSS destas células está altamente metilada. Por outro lado, quando a expressão deste lncRNA em melanoma primário está em maior nível de expressão, também está aliada a baixos níveis de metilação na TSS. Portanto, estes dados sugerem que este lncRNA pode estar sendo ativado no melanoma primário devido à desmetilação da região promotora, que, até então, evitava ativação da expressão deste gene. Essa relação entre metilação e regulação da expressão gênica é importante principalmente para lncRNAs do tipo *antisense*, que muitas vezes compartilham a região promotora com sua contraparte codificadora (Lin et al., 2015; Tufarelli et al., 2003). Um fato ainda a ser investigado foi a ausência do lncRNA PRAME-AS1 como gene diferencialmente expresso também nas linhagens de melanoma metastático.

Análises exploratórias demonstraram que a expressão deste lncRNA é específica de testículo normal e de alguns tipos de tumor, sendo encontrada a maior expressão mediana em melanoma. Na literatura, alguns genes com esse padrão de expressão similar em testículo e câncer são conhecidos como *cancer-testis* (CT) genes, e são representados pela similaridade entre os processos de espermatogênese e tumorigênese, sendo observados em diversos tipos de tumor (C. Wang et al., 2016). Mais recentemente, foram identificados mais de mil lncRNAs para 14 tipos de câncer que possuem padrão de expressão de CT genes, sendo associados à instabilidade do genoma e relação com potencial maligno (Qin et al., 2017). No mesmo estudo, foi sugerido que os elementos regulatórios específicos dos testículos e a hipometilação da região

promotora podem ser mecanismos de ativação de CT lncRNAs (Qin et al., 2017). Deste modo, é possível que o lncRNA PRAME-AS1 seja considerado também um CT lncRNA, e, tal como, a regulação da sua expressão gênica seja mediada pela metilação da região promotora.

Além disso, nesta mesma oportunidade foi verificada correlação entre a expressão do mRNA PRAME e seu lncRNA antisenso PRAME-AS1. Esta relação é importante, pois o gene PRAME já é muito bem estudado e possui um claro perfil gênico de especificidade CT (Ikeda et al., 1997; Oehler et al., 2009), mas o lncRNA PRAME-AS1 até o momento não havia sido investigado em nenhum tipo de câncer, nem relacionado à progressão tumoral ou qualquer outra informação na literatura científica.

6. CONCLUSÕES

Os dados obtidos e as análises realizadas neste trabalho nos permitem concluir que:

A análise do transcriptoma demonstrou que o melanoma primário e metastático não possui muita diferença entre si, mas que ambos diferem bem dos melanócitos;

A expressão dos lncRNAs é capaz de diferenciar melhor os agrupamentos de MELC, PRIM e MET do que considerando todos os genes;

Existem diversos lncRNAs diferencialmente expressos entre MELC x PRIM, MELC x MET e somente 5 lncRNAs entre PRIM x MET, todos sub-expressos em MET;

O lncRNA ZEB1-AS1 está diferencialmente expresso em melanoma nas comparações MELC x MET e MELC x PRIM;

A expressão do lncRNA ZEB1-AS1 está significativamente correlacionada com a expressão do mRNA ZEB1 em amostras de melanoma do TCGA;

O lncRNA ZEB1-AS1 possui significativa maior expressão em amostras metastáticas quando comparadas com amostras de melanoma primário do TCGA;

O lncRNA ZEB1-AS1 possui significativa maior expressão em amostras do subgrupo BRAF e RAS quando comparado com o grupo triplamente negativo;

O lncRNA ZEB1-AS1 possui significativa associação positiva com invasão e negativa com proliferação em linhagens melanocíticas e amostras do TCGA segundo GSVA;

Genes correlacionados positivamente com o lncRNA ZEB1-AS1 estão enriquecidos para regulação da transcrição e processamento de RNA na análise de enriquecimento funcional e ontologia gênica;

O novo lncRNA U73166 está diferencialmente expresso na comparação MELC x MET;

O lncRNA U73166 possui significativa associação positiva com invasão e negativa com proliferação em linhagens melanocíticas e amostras do TCGA segundo dados da GSVA;

O lncRNA U73166 possui maior expressão em linhagens celulares de melanoma primário e metastático quando comparado com melanócitos;

Em tecidos normais, o lncRNA U73166 possui maior expressão em testículo do que nos demais tecidos;

O silenciamento do lncRNA U73166 diminuiu significativamente a capacidade de invasão de células de melanoma;

O silenciamento do lncRNA U73166 diminuiu significativamente a capacidade de migração *transwell* de células de melanoma;

O silenciamento do lncRNA U73166 diminuiu significativamente a capacidade de migração coletiva de células de melanoma;

O silenciamento do lncRNA U73166 diminuiu significativamente a capacidade de invasão de células de melanoma;

A expressão do lncRNA U73166 está enriquecida no núcleo quando comparado ao citoplasma;

O lncRNA U73166 possui maior expressão em linhagens celulares e paciente que adquiriram resistência ao tratamento com Vemurafenib;

O lncRNA U73166 interage fisicamente com diversas proteínas entre as quais HNRNPA2B1, SRSF1 e RBFOX2;

As proteínas HNRNPA2B1, SRSF1 e RBFOX2 são associadas com invasão e metástase e possuem significativa correlação de expressão com o lncRNA U73166;

Existem diversos lncRNAs que estão diferencialmente metilados na comparação entre amostras de melanoma e melanócitos;

Existem cerca de 20 lncRNAs que estão diferencialmente expressos e com regiões de TSS diferencialmente metiladas;

O novo lncRNA PRAME-AS1 está diferencialmente expresso na comparação MELC x PRIM;

O lncRNA PRAME-AS1 possui padrão de expressão do tipo Cancer-Testis (CT);

O lncRNA PRAME-AS1 possui expressão maior em linhagens de melanoma quando comparado com melanócitos;

O lncRNA PRAME-AS1 possui expressão significativamente correlacionada com o mRNA PRAME em linhagens celulares de melanoma primário;

O lncRNA PRAME-AS1 é expresso de modo similar no núcleo e no citoplasma de células de melanoma;

O lncRNA PRAME-AS1 está diferencialmente metilado em sua região promotora em amostras de melanoma quando comparado com melanócitos;

A região TSS do lncRNA PRAME-AS1 possui alto nível de metilação em linhagens de melanócitos e em amostras de melanoma possui baixos níveis de metilação;

Os lncRNAs apresentados neste trabalho e que anteriormente não haviam sido descritos na literatura científica podem contribuir para uma melhor compreensão dos mecanismos associados aos lncRNAs, desenvolvimento e progressão do melanoma;

Os lncRNAs apresentados neste trabalho demonstram ser potenciais candidatos para estudos mais aprofundados e que envolvam não somente outros ensaios funcionais, mas também a dissecção de mecanismos de atuação molecular;

Os lncRNAs que foram descritos neste trabalho podem ser úteis para o desenvolvimento de alvos de tratamento, prognóstico e diagnóstico de melanoma.

Tabela 1 - Genes associados com assinatura de *status* invasivo

Nº	Ensembl ID	Gene Symbol	Gene Name
1	ENSG00000148848	ADAM12	ADAM metalloproteinase domain 12
2	ENSG00000114019	AMOTL2	angiomin like 2
3	ENSG00000167601	AXL	AXL receptor tyrosine kinase
4	ENSG00000023445	BIRC3	baculoviral IAP repeat-containing 3
5	ENSG00000140945	CDH13	cadherin 13, H-cadherin (heart)
6	ENSG00000058091	CDK14	cyclin-dependent kinase 14
7	ENSG00000197467	COL13A1	collagen, type XIII, alpha 1
8	ENSG00000150938	CRIM1	cysteine rich transmembrane BMP regulator 1 (chordin-like)
9	ENSG00000103196	CRISPLD2	cysteine-rich secretory protein LCCL domain containing 2
10	ENSG00000142871	CYR61	cysteine-rich, angiogenic inducer, 61
11	ENSG00000188641	DPYD	dihydropyrimidine dehydrogenase
12	ENSG00000115380	EFEMP1	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 1
13	ENSG00000146648	EGFR	epidermal growth factor receptor
14	ENSG00000164251	F2RL1	coagulation factor II (thrombin) receptor-like 1
15	ENSG00000138685	FGF2	fibroblast growth factor 2 (basic)
16	ENSG00000136068	FLNB	filamin B, beta
17	ENSG00000251493	FOXD1	forkhead box D1
18	ENSG00000134363	FST	Follistatin
19	ENSG00000180340	FZD2	frizzled homolog 2 (Drosophila)
20	ENSG00000173706	HEG1	HEG homolog 1 (zebrafish)
21	ENSG00000153976	HS3ST3A1	heparan sulfate (glucosamine) 3-O-sulfotransferase 3A1
22	ENSG00000164171	ITGA2	integrin, alpha 2
23	ENSG00000005884	ITGA3	integrin, alpha 3
24	ENSG00000156113	KCNMA1	potassium large conductance calcium-activated channel M alpha 1
25	ENSG00000134013	LOXL2	lysyl oxidase-like 2
26	ENSG00000138119	MYOF	myoferlin
27	ENSG00000099250	NRP1	neuropilin 1
28	ENSG00000182667	NTM	neurotrimin
29	ENSG00000074590	NUAK1	NUAK family, SNF1-like kinase, 1
30	ENSG00000145623	OSMR	oncostatin M receptor
31	ENSG00000145431	PDGFC	platelet derived growth factor C
32	ENSG00000128567	PODXL	podocalyxin-like
33	ENSG00000196754	S100A2	S100 calcium binding protein A2
34	ENSG00000197208	SLC22A4	solute carrier family 22, member 4
35	ENSG00000145147	SLIT2	slit homolog 2
36	ENSG00000078269	SYNJ2	synaptojanin 2
37	ENSG00000196628	TCF4	transcription factor 4
38	ENSG00000137801	THBS1	thrombospondin 1
39	ENSG00000106829	TLE4	transducin-like enhancer of split 4

40	ENSG00000164761	TNFRSF11B	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b
41	ENSG00000146242	TPBG	trophoblast glycoprotein
42	ENSG00000140416	TPM1	tropomyosin 1 (alpha)
43	ENSG00000065308	TRAM2	translocation associated membrane protein 2
44	ENSG00000114251	WNT5A	wingless-type MMTV integration site family, member 5A
45	ENSG00000148516	ZEB1	zinc finger E-box binding homeobox 1

Tabela 2 - Genes associados com assinatura de *status* proliferativo

Nº	Ensembl ID	Gene Symbol	Gene Name
1	ENSG00000102575	ACP5	acid phosphatase 5, tartrate resistant
2	ENSG00000078295	ADCY2	adenylate cyclase 2 (brain)
3	ENSG00000130203	APOE	apolipoprotein E
4	ENSG00000104763	ASAH1	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase) 1
5	ENSG00000101197	BIRC7	baculoviral IAP repeat-containing 7
6	ENSG00000154642	C21orf91	chromosome 21 open reading frame 91
7	ENSG00000092529	CAPN3	calpain 3, (p94)
8	ENSG00000039068	CDH1	cadherin 1, type 1, E-cadherin (epithelial)
9	ENSG00000123374	CDK2	cyclin-dependent kinase 2
10	ENSG00000176749	CDK5R1	cyclin-dependent kinase 5, regulatory subunit 1 (p35)
11	ENSG00000079385	CEACAM1	carcinoembryonic antigen-related cell adhesion molecule 1
12	ENSG00000196730	DAPK1	death-associated protein kinase 1
13	ENSG00000080166	DCT	dopachrome tautomerase
14	ENSG00000185442	FAM174B	family with sequence similarity 174, member B
15	ENSG00000115339	GALNT3	UDP-N-acetyl- -D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase 3
16	ENSG00000111670	GNPTAB	N-acetylglucosamine-1-phosphate transferase, alpha and beta subunits
17	ENSG00000046653	GPM6B	glycoprotein M6B
18	ENSG00000101850	GPR143	G protein-coupled receptor 143
19	ENSG00000167191	GPRC5B	G protein-coupled receptor, family C, group 5, member B
20	ENSG00000056998	GYG2	glycogenin 2
21	ENSG00000100099	HPS4	Hermansky-Pudlak syndrome 4
22	ENSG00000109452	INPP4B	inositol polyphosphate-4-phosphatase, type II, 105kDa
23	ENSG00000137265	IRF4	interferon regulatory factor 4
24	ENSG00000116679	IVNS1ABP	influenza virus NS1A binding protein
25	ENSG00000189337	KAZ	kazrin
26	ENSG00000197971	MBP	myelin basic protein
27	ENSG00000135596	MICAL1	microtubule associated monooxygenase, calponin and LIM domain containing 1
28	ENSG00000187098	MITF	microphthalmia-associated transcription factor
29	ENSG00000120215	MLANA	melan-A
30	ENSG00000176658	MYO1D	myosin ID
31	ENSG00000119508	NR4A3	nuclear receptor subfamily 4, group A, member 3
32	ENSG00000104044	OCA2	oculocutaneous albinism II

33	ENSG00000112137	PHACTR1	phosphatase and actin regulator 1
34	ENSG00000087842	PIR	pirin (iron-binding nuclear protein)
35	ENSG00000136040	PLXNC1	plexin C1
36	ENSG00000185664	PMEL	Premelanosome protein
37	ENSG00000069974	RAB27A	RAB27A, member RAS oncogene family
38	ENSG00000123892	RAB38	RAB38, member RAS oncogene family
39	ENSG00000147509	RGS20	regulator of G-protein signaling 20
40	ENSG00000119729	RHOQ	ras homolog gene family, member Q
41	ENSG00000025039	RRAGD	Ras-related GTP binding D
42	ENSG00000092421	SEMA6A	sema domain, transmembrane domain, and cytoplasmic domain, 6A
43	ENSG00000198053	SIRPA	signal-regulatory protein alpha
44	ENSG00000164175	SLC45A2	solute carrier family 45, member 2
45	ENSG00000064225	ST3GAL6	ST3 beta-galactoside alpha-2,3-sialyltransferase 6
46	ENSG00000079950	STX7	syntaxin 7
47	ENSG00000157873	TNFRSF14	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 14
48	ENSG00000134160	TRPM1	transient receptor potential cation channel, subfamily M, member 1
49	ENSG00000077498	TYR	tyrosinase
50	ENSG00000107165	TYRP1	tyrosinase-related protein 1
51	ENSG00000105875	WDR91	WD repeat domain 91
52	ENSG00000039319	ZFYVE16	zinc finger, FYVE domain containing 16

Tabela 5 - Genes de lncRNAs diferencialmente expressos entre MELC x MET

V1	logFC	FDR	gene_name
ENSG00000260604.2	9.86130205000525	0.0458696129706412	RP1-140K8.5
ENSG00000244300.2	9.74747553972053	0.0437700021117106	GATA2-AS1
ENSG00000130600.16	9.05860607285293	0.0323678685398528	H19
ENSG00000237036.4	8.95469052924	4.57664223862233e-05	ZEB1-AS1
ENSG00000259153.1	8.76471091546181	0.0304797370844595	RP6-65G23.3
ENSG00000282057.1	8.64813113057347	0.0357033035604002	RP4-621F18.2
ENSG00000196893.3	-8.52524142491595	4.90898630415075e-05	AC090286.4
ENSG00000272502.1	8.42077860633344	0.00581210269165942	RP11-713M15.2
ENSG00000204860.4	8.29128951408419	0.0346049845125461	FAM201A
ENSG00000231806.2	8.05834308366974	0.040991744531328	PCAT7
ENSG00000268812.3	7.9594636115185	0.00357841607230885	RP1-102K2.8
ENSG00000235280.2	7.86196540760427	0.040991744531328	MCF2L-AS1
ENSG00000205628.2	7.74107422357771	0.0260550455889464	LINC01446
ENSG00000231528.2	7.64697232743061	0.00538604654698438	FAM225A
ENSG00000233610.1	-7.48146860899573	4.57664223862233e-05	LINC00462
ENSG00000272482.1	7.10075090690148	0.0304797370844595	RP11-474O21.5
ENSG00000273312.2	-7.09122493863134	0.00113981626095665	RP11-425A6.5
ENSG00000206195.10	7.06013800623675	7.74172354673902e-07	DUXAP8
ENSG00000228033.5	-6.85229994901361	0.0136016304336643	AC010967.2
ENSG00000279712.1	6.82133848644908	0.0253212608967732	CTA-280A3.2

ENSG00000224271.5	6.77078481482535	0.00231071463470034	RP11-191L9.4
ENSG00000251603.1	6.65948316032746	0.030370047231071	RP11-164P12.4
ENSG00000257497.2	6.53696950974495	0.0281373477277613	RP11-585P4.5
ENSG00000272872.1	6.5149547064951	0.0383228345905492	LL22NC03-N14H11.1
ENSG00000232104.3	6.49814397678646	0.0373652137985908	RFX3-AS1
ENSG00000271857.1	6.41988958342434	0.0407232873975041	RP1-244F24.1
ENSG00000259345.5	6.41042607369236	0.0458696129706412	RP11-624L4.1
ENSG00000227496.1	6.266969287746	0.0290673693559173	RP11-145A3.1
ENSG00000227359.1	-6.24130522371065	3.9015434672909e-05	AC017074.2
ENSG00000236700.5	-5.84671212015451	0.046625551689037	LINC01010
ENSG00000205181.5	-5.34992271368275	0.019599002440641	LINC00654
ENSG00000274029.1	-4.86789149953457	0.0397171031797151	RP11-340F14.6
ENSG00000248690.6	4.59990799847652	0.0154295234185564	HAS2-AS1
ENSG00000215014.4	-4.47744448489947	1.0073423991193e-06	RP5-832C2.5
ENSG00000230454.1	4.32342573331294	0.0384401527585048	U73166.2
ENSG00000235904.2	4.14055906448355	0.0225609260332508	RBMS3-AS3
ENSG00000176349.11	-4.09430828464829	0.0263566544553272	AC110781.3
ENSG00000248964.6	-3.5853806597399	0.0272726768613538	RP11-94H18.1
ENSG00000279192.1	3.51891982351102	0.0423055766026029	PWAR5
ENSG00000225953.2	3.39629371549518	0.0466654750621897	SATB2-AS1
ENSG00000271347.1	3.31613948348069	0.0298445077684541	RP11-701H24.7
ENSG00000279267.1	-3.31318703862017	0.0335183844068618	RP11-395L14.18
ENSG00000276449.1	-3.00802833440363	0.0251281179015623	AC004076.5
ENSG00000255737.2	-2.50402666718869	0.0227478322231631	AGAP2-AS1
ENSG00000234779.1	-2.39413507627077	0.0484246296601241	RP11-62F24.2
ENSG00000272068.1	10.5429912149299	0.0114531782353249	RP11-284F21.9
ENSG00000240405.5	10.0570388874431	0.006612892411723	SAMMSON

Tabela 6 - Genes de lncRNAs diferencialmente expressos entre MELC x PRIM

V1	logFC	FDR	gene_name
ENSG00000130600.16	9.56214539506221	0.0364221615739679	H19
ENSG00000237036.4	8.90703721643693	0.000104731203391746	ZEB1-AS1
ENSG00000268812.3	8.02295309924974	0.00518107681358511	RP1-102K2.8
ENSG00000271857.1	7.87902587724617	0.0126699317714598	RP1-244F24.1
ENSG00000220891.1	7.54832888725717	0.0489158816551748	LL22NC03-63E9.3
ENSG00000231528.2	7.34378411804219	0.013758219419998	FAM225A
ENSG00000257497.2	7.25468433934551	0.0230192881428347	RP11-585P4.5
ENSG00000272872.1	6.96872096078125	0.0410490288087887	LL22NC03-N14H11.1
ENSG00000206195.10	6.73908091396565	3.07122223450112e-06	DUXAP8
ENSG00000224271.5	6.48595081500287	0.00601288512387374	RP11-191L9.4
ENSG00000248690.6	5.49614480423863	0.00315241784753047	HAS2-AS1
ENSG00000224596.7	4.40046423216558	0.024642687369785	ZMIZ1-AS1
ENSG00000237595.3	4.1185822571918	0.0234481183945986	RP11-112L6.3
ENSG00000225953.2	3.86989449643738	0.0253944844872893	SATB2-AS1

ENSG00000233593.8	3.62226956254165	0.0233072566046091	RP4-665J23.1
ENSG00000240405.5	10.233790392932	0.00854667216114227	SAMMSON
ENSG00000196893.3	-6.95078748695678	3.41242011551682e-05	AC090286.4
ENSG00000273312.2	-6.91466928527405	0.000166601141730886	RP11-425A6.5
ENSG00000260577.2	-6.33500849101511	0.010714374510488	RP11-615I2.2
ENSG00000261409.1	-6.11007210691486	0.0372554447673389	RP6-24A23.7
ENSG00000233610.1	-5.84945142994359	8.16105646055792e-05	LINC00462
ENSG00000227359.1	-5.63799823320656	6.78038507100175e-06	AC017074.2
ENSG00000204832.9	-5.51923735582079	0.0134428661729712	ST8SIA6-AS1
ENSG00000215014.4	-4.60090584624549	5.6827933422162e-09	RP5-832C2.5
ENSG00000205181.5	-4.27482554800093	0.0463233835429284	LINC00654
ENSG00000267231.1	-3.75533197475565	0.0253944844872893	AC005786.5
ENSG00000176349.11	-3.55065789683776	0.0186240473118218	AC110781.3
ENSG00000279267.1	-2.89575039286847	0.0427696888346694	RP11-395L14.18
ENSG00000255737.2	-2.33853246305428	0.0384477098753539	AGAP2-AS1

Tabela 7 - Genes de lncRNAs diferencialmente expressos entre PRIM x MET

V1	logFC	FDR	gene_name
ENSG00000229807.10	-8.60431514431408	0.00541949444861701	XIST
ENSG00000236333.3	-7.18777162720129	0.0288212045200073	TRHDE-AS1
ENSG00000258483.2	-3.27039162438821	0.0458800972536335	AC144835.1
ENSG00000271850.1	-5.87873611906627	0.0299538008423526	RP11-16D22.2
ENSG00000275216.1	-8.0474276087088	0.00597334932446269	RP11-54H7.4

Tabela 8 – RBP interagindo com o lncRNA U73166 (experimentos de CLIP-Seq)

RBP	clusterNum	clipExpNum	clipIDnum
U2AF2	10	10	20
SRSF1	8	7	11
TAF15	7	7	12
HNRNPA1	8	6	13
HNRNPA2B1	12	6	22
CSTF2T	11	4	22
DDX54	4	4	5
DGCR8	5	4	5
HNRNPU	9	4	15
RBFOX2	5	4	8
HNRNPK	2	3	3

HNRNPUL1	6	3	6
PRPF8	3	3	4
SLTM	4	3	5
ADAR	3	2	4
AIFM1	3	2	3
BUD13	6	2	6
EIF4A3	8	2	9
ELAVL1	2	2	4
FAM120A	7	2	8
FBL	4	2	4
GTF2F1	2	2	3
LIN28	3	2	3
LSM11	2	2	2
NONO	3	2	3
NUMA1	8	2	10
PCBP2	2	2	4
RANGAP1	3	2	4
SAFB2	4	2	5
TIA1	1	2	2
U2AF1	2	2	2
ZNF184	6	2	7
AUH	3	1	3
DKC1	3	1	3
FMR1	2	1	2
FUS	1	1	1
IGF2BP2	1	1	1
ILF3	1	1	1
NOP56	3	1	3
NOP58	3	1	3
RBM10	1	1	1
SMNDC1	1	1	1
SRSF10	1	1	1
SRSF9	1	1	1
VIM	1	1	1
XRN2	2	1	2

Tabela 9 – TABELA com informações da análise “COHCAP.avg.by.site”

cpg.island	genes	methylation.status
chr1:1496761-1496986	SSU72	Increased Methylation
chr1:221057463-221057757	HLX	Increased Methylation
chr1:221060850-221061071	NA	Increased Methylation
chr1:221068782-221069159	NA	Increased Methylation

chr1:40769186-40769871	COL9A2	Increased Methylation
chr1:92945907-92952609	GFI1	Increased Methylation
chr10:101281181-101282116	NA	Increased Methylation
chr10:630309-630950	DIP2C	Increased Methylation
chr10:669070-669336	DIP2C	Increased Methylation
chr10:711896-712395	C10orf108;DIP2C	Increased Methylation
chr10:76573195-76573507	NA	Increased Methylation
chr10:8100384-8100768	GATA3	Increased Methylation
chr10:94455524-94455896	NA	Increased Methylation
chr12:12939713-12940391	APOLD1	Increased Methylation
chr13:114145965-114146172	TMCO3	Increased Methylation
chr13:114875198-114875418	RASA3	Increased Methylation
chr13:36052553-36053119	MIR548F5;MAB21L1;NBEA	Increased Methylation
chr14:103430534-103430787	CDC42BPB	Increased Methylation
chr14:20903395-20903720	KLHL33	Increased Methylation
chr15:37179516-37179782	LOC145845	Increased Methylation
chr15:37387386-37387614	MEIS2	Increased Methylation
chr15:89920793-89922768	LOC254559	Increased Methylation
chr16:1514412-1514859	CLCN7	Increased Methylation
chr16:31053479-31053800	NA	Increased Methylation
chr16:57562451-57563325	CCDC102A	Increased Methylation
chr16:89438503-89438850	ANKRD11	Increased Methylation
chr16:89985913-89986356	NA	Increased Methylation
chr17:1627745-1629897	WDR81	Increased Methylation
chr17:6898820-6900427	ALOX12	Increased Methylation
chr17:76037074-76037323	TNRC6C	Decreased Methylation
chr17:77922721-77922973	TBC1D16	Increased Methylation
chr17:77951845-77952291	TBC1D16	Increased Methylation
chr17:7832532-7833164	KCNAB3	Increased Methylation
chr17:79026043-79026355	BAIAP2	Increased Methylation
chr17:909981-910442	ABR	Increased Methylation
chr19:12707696-12708114	ZNF490	Increased Methylation
chr19:39797786-39799250	LRFN1	Increased Methylation
chr19:49713495-49714119	TRPM4	Increased Methylation
chr19:58715220-58716033	ZNF274	Increased Methylation
chr19:7580824-7581415	ZNF358	Increased Methylation
chr2:177355071-177355525	NA	Increased Methylation
chr2:27529083-27531465	UCN	Increased Methylation
chr2:27665251-27665670	KRTCAP3	Increased Methylation
chr2:37571676-37572397	QPCT	Increased Methylation
chr20:33762403-33762774	PROCR	Increased Methylation
chr20:50417312-50419045	SALL4	Increased Methylation
chr21:34405577-34406538	NA	Increased Methylation
chr22:22901386-22901698	LOC648691;PRAME	Decreased Methylation
chr22:30476012-30476530	HORMAD2	Increased Methylation
chr3:147077115-147077672	NA	Increased Methylation
chr3:147108511-147111703	ZIC4	Increased Methylation
chr3:147130342-147130577	ZIC1	Increased Methylation
chr3:157812053-157812764	NA	Increased Methylation
chr3:157815581-157816095	NA	Increased Methylation

chr3:184209094-184209343	NA	Increased Methylation
chr4:151500763-151501299	LRBA	Increased Methylation
chr4:1595293-1595539	NA	Increased Methylation
chr4:3374733-3374998	RGS12	Increased Methylation
chr4:4859632-4860191	MSX1	Increased Methylation
chr4:4864456-4864834	MSX1	Increased Methylation
chr4:80885844-80886148	ANTXR2	Increased Methylation
chr4:81128229-81128691	NA	Increased Methylation
chr5:10649367-10650352	ANKRD33B	Increased Methylation
chr5:158531375-158531648	NA	Increased Methylation
chr5:43037259-43037520	NA	Increased Methylation
chr6:106441986-106442912	NA	Increased Methylation
chr6:26225386-26225790	HIST1H3E	Increased Methylation
chr6:30038881-30039477	RNF39	Increased Methylation
chr6:30095173-30095610	NA	Increased Methylation
chr6:31650648-31651292	NA	Increased Methylation
chr6:32116590-32117229	NA	Increased Methylation
chr6:32847498-32847846	PPP1R2P1	Increased Methylation
chr6:70576974-70577572	COL19A1	Decreased Methylation
chr7:152063834-152064080	MLL3	Increased Methylation
chr7:1890830-1891088	MAD1L1	Increased Methylation
chr7:2645524-2645765	IQCE	Increased Methylation
chr7:6311322-6312526	CYTH3	Increased Methylation
chr7:8008097-8009495	GLCCI1	Increased Methylation
chr8:130995921-130996149	NA	Increased Methylation
chr8:20107432-20107658	LZTS1	Increased Methylation
chr8:38831592-38832353	HTRA4;PLEKHA2	Increased Methylation
chr8:637393-638251	ERICH1	Increased Methylation
chr8:99984584-99985072	NA	Increased Methylation
chrX:48684837-48686064	NA	Increased Methylation
chrX:70273009-70273255	NA	Increased Methylation

7. BIBLIOGRAFIA

- Akbani, R., Akdemir, K. C., Aksoy, B. A., Albert, M., Ally, A., Amin, S. B., Arachchi, H., Arora, A., Auman, J. T., Ayala, B., Baboud, J., Balasundaram, M., Balu, S., Barnabas, N., Bartlett, J., Bartlett, P., Bastian, B. C., Baylin, S. B., Behera, M., ... Zou, L. (2015). Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell*, 161(7), 1681–1696. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.05.044>
- Albert, M. R., & Weinstock, M. A. (2003). Keratinocyte Carcinoma. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 53(5), 292–302. <https://doi.org/10.3322/canjclin.53.5.292>
- Alqathama, A. (2020). BRAF in malignant melanoma progression and metastasis: potentials and challenges. *American Journal of Cancer Research*, 10(4), 1103–1114. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32368388>
- American Cancer Society. *Cancer Facts & Figures 2014*. Atlanta: American Cancer Society; 2014. (2014). Cancer Facts & Figures 2014. Atlanta: American Cancer Society; <http://www.cancer.org/acs/groups/content/@research/documents/webcontent/acspc-042151.pdf>
- Amin, V., Harris, R. A., Onuchic, V., Jackson, A. R., Charnecki, T., Paithankar, S., Lakshmi Subramanian, S., Riehle, K., Coarfa, C., & Milosavljevic, A. (2015). Epigenomic footprints across 111 reference epigenomes reveal tissue-specific epigenetic regulation of lincRNAs. *Nature Communications*, 6(1), 6370. <https://doi.org/10.1038/ncomms7370>
- Arozarena, I., & Wellbrock, C. (2017). Targeting invasive properties of melanoma cells. In *FEBS Journal* (Vol. 284, Issue 14, pp. 2148–2162). Blackwell Publishing Ltd. <https://doi.org/10.1111/febs.14040>
- Ascierto, P. A., Kirkwood, J. M., Grob, J.-J., Simeone, E., Grimaldi, A. M., Maio, M., Palmieri, G., Testori, A., Marincola, F. M., & Mozzillo, N. (2012). The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *Journal of Translational Medicine*, 10, 85. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-10-85>
- Bairoch, A. (2018). The cellosaurus, a cell-line knowledge resource. *Journal of Biomolecular Techniques*, 29(2), 25–38. <https://doi.org/10.7171/jbt.18-2902-002>
- Barbie, D. A., Tamayo, P., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Moody, S. E., Dunn, I. F., Schinzel, A. C., Sandy, P., Meylan, E., Scholl, C., Fröhling, S., Chan, E. M., Sos, M. L., Michel, K., Mermel, C., Silver, S. J., Weir, B. A., Reiling, J. H., Sheng, Q., ... Hahn, W. C. (2009). Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature*, 462(7269), 108–112. <https://doi.org/10.1038/nature08460>
- Bartel, D. P. (2004). MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. In *Cell* (Vol. 116, Issue 2, pp. 281–297). Cell Press. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(04\)00045-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(04)00045-5)
- Berger, M. F., Hodis, E., Heffernan, T. P., Deribe, Y. L., Lawrence, M. S., Protopopov, A., Ivanova, E., Watson, I. R., Nickerson, E., Ghosh, P., Zhang, H., Zeid, R., Ren, X., Cibulskis, K., Sivachenko, A. Y., Wagle, N., Sucker, A., Sougnez, C., Onofrio, R., ... Garraway, L. A. (2012). Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature*, 485(7399), 502–506. <https://doi.org/10.1038/nature11071>
- Berretta, J., & Morillon, A. (2009). Pervasive transcription constitutes a new level of eukaryotic genome regulation. *EMBO Reports*, 10(9), 973–982. <https://doi.org/10.1038/embor.2009.181>
- Bommareddy, P. K., Patel, A., Hossain, S., & Kaufman, H. L. (2017). Talimogene Laherparepvec (T-VEC) and Other Oncolytic Viruses for the Treatment of Melanoma. *American Journal of Clinical*

Dermatology, 18(1). <https://doi.org/10.1007/s40257-016-0238-9>

- Braeutigam, C., Rago, L., Rolke, A., Waldmeier, L., Christofori, G., & Winter, J. (2014). The RNA-binding protein Rbfox2: An essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene*, 33(9), 1082–1092. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.50>
- Brown, C. J., Ballabio, A., Rupert, J. L., Lafreniere, R. G., Grompe, M., Tonlorenzi, R., & Willard, H. F. (1991). A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 349(6304), 38–44. <https://doi.org/10.1038/349038a0>
- Cannon-Albright, L. A., Goldgar, D. E., Meyer, L. J., Lewis, C. M., Anderson, D. E., Fountain, J. W., Hegi, M. E., Wiseman, R. W., Petty, E. M., & Bale, A. E. (1992). Assignment of a locus for familial melanoma, MLM, to chromosome 9p13-p22. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5085), 1148–1152. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1439824>
- Caramel, J., Papadogeorgakis, E., Hill, L., Browne, G. J., Richard, G., Wierinckx, A., Saldanha, G., Osborne, J., Hutchinson, P., Tse, G., Lachuer, J., Puisieux, A., Pringle, J. H., Ansieau, S., & Tulchinsky, E. (2013). A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell*, 24(4), 466–480. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2013.08.018>
- Carlevaro-Fita, J., & Johnson, R. (2019). Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization. In *Molecular Cell* (Vol. 73, Issue 5, pp. 869–883). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.02.008>
- Carreira, S., Goodall, J., Denat, L., Rodriguez, M., Nuciforo, P., Hoek, K. S., Testori, A., Larue, L., & Goding, C. R. (2006). Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes & Development*, 20(24), 3426–3439. <https://doi.org/10.1101/gad.406406>
- Celebi, J. T., Shendrik, I., Silvers, D. N., & Peacocke, M. (2000). Identification of PTEN mutations in metastatic melanoma specimens. *Journal of Medical Genetics*, 37(9), 653–657. http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1734683&tool=pmcentrez&render_type=abstract
- Cesana, M., Cacchiarelli, D., Legnini, I., Santini, T., Sthandier, O., Chinappi, M., Tramontano, A., & Bozzoni, I. (2011). A long noncoding RNA controls muscle differentiation by functioning as a competing endogenous RNA. *Cell*, 147(2), 358–369. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.028>
- Chen, L., Yang, H., Xiao, Y., Tang, X., Li, Y., Han, Q., Fu, J., Yang, Y., & Zhu, Y. (2016). LncRNA GAS5 is a critical regulator of metastasis phenotype of melanoma cells and inhibits tumor growth in vivo. *OncoTargets and Therapy*, 9, 4075–4087. <https://doi.org/10.2147/OTT.S98203>
- Chen, Y., Dhupelia, A., & Schoenherr, C. J. (2009). The Igf2/H19 imprinting control region exhibits sequence-specific and cell-type-dependent DNA methylation-mediated repression. *Nucleic Acids Research*, 37(3), 793–803. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn985>
- Chin, L., Garraway, L. A., & Fisher, D. E. (2006). Malignant melanoma: genetics and therapeutics in the genomic era. *Genes & Development*, 20(16), 2149–2182. <https://doi.org/10.1101/gad.1437206>
- Clark, W. H., Elder, D. E., Guerry, D., Epstein, M. N., Greene, M. H., & Van Horn, M. (1984). A study of tumor progression: the precursor lesions of superficial spreading and nodular melanoma. *Human Pathology*, 15(12), 1147–1165. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6500548>
- Dai, S., Zhang, J., Huang, S., Lou, B., Fang, B., Ye, T., Huang, X., Chen, B., & Zhou, M. (2017). HNRNPA2B1 regulates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells through the ERK/snail signalling pathway. *Cancer Cell International*, 17(1), 12.

<https://doi.org/10.1186/s12935-016-0368-4>

- Dalay, N. (2016). Role of the lncRNAs in malignant melanoma and their involvement in metastasis. *Translational Cancer Research*, 5(4), S758–S764. <https://doi.org/10.21037/tcr.2016.10.93>
- Damsky, W. E., Theodosakis, N., & Bosenberg, M. (2014). Melanoma metastasis: new concepts and evolving paradigms. *Oncogene*, 33(19), 2413–2422. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.194>
- Davies, H., Bignell, G. R., Cox, C., Stephens, P., Edkins, S., Clegg, S., Teague, J., Woffendin, H., Garnett, M. J., Bottomley, W., Davis, N., Dicks, E., Ewing, R., Floyd, Y., Gray, K., Hall, S., Hawes, R., Hughes, J., Kosmidou, V., ... Futreal, P. A. (2002). Mutations of the BRAF gene in human cancer. *Nature*, 417(6892), 949–954. <https://doi.org/10.1038/nature00766>
- de Unamuno Bustos, B., Murria Estal, R., Pérez Simó, G., de Juan Jimenez, I., Escutia Muñoz, B., Rodríguez Serna, M., Alegre de Miquel, V., Llavador Ros, M., Ballester Sánchez, R., Nagore Enguñados, E., Palanca Suela, S., & Botella Estrada, R. (2017). Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel. *Scientific Reports*, 7(1), 495. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00606-w>
- Delás, M. J., Jackson, B. T., Kovacevic, T., Vangelisti, S., Munera Maravilla, E., Wild, S. A., Stork, E. M., Erard, N., Knott, S. R. V., & Hannon, G. J. (2019). lncRNA Spehd Regulates Hematopoietic Stem and Progenitor Cells and Is Required for Multilineage Differentiation. *Cell Reports*, 27(3), 719–729.e6. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.03.080>
- Derrien, T., Johnson, R., Bussotti, G., Tanzer, A., Djebali, S., Tilgner, H., Guernec, G., Martin, D., Merkel, A., Knowles, D. G., Lagarde, J., Veeravalli, L., Ruan, X., Ruan, Y., Lassmann, T., Carninci, P., Brown, J. B., Lipovich, L., Gonzalez, J. M., ... Guigó, R. (2012). The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Research*, 22(9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>
- Djebali, S., Davis, C. A., Merkel, A., Dobin, A., Lassmann, T., Mortazavi, A., Tanzer, A., Lagarde, J., Lin, W., Schlesinger, F., Xue, C., Marinov, G. K., Khatun, J., Williams, B. A., Zaleski, C., Rozowsky, J., Röder, M., Kokocinski, F., Abdelhamid, R. F., ... Gingeras, T. R. (2012). Landscape of transcription in human cells. *Nature*, 489(7414), 101–108. <https://doi.org/10.1038/nature11233>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., Batut, P., Chaisson, M., & Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(1), 15–21. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bts635>
- Dong, Y., Richards, J.-A., Gupta, R., Aung, P. P., Emley, A., Kluger, Y., Dogra, S. K., Mahalingam, M., & Wajapeyee, N. (2014). PTEN functions as a melanoma tumor suppressor by promoting host immune response. *Oncogene*, 33(38), 4632–4642. <https://doi.org/10.1038/onc.2013.409>
- Du, J., Widlund, H. R., Horstmann, M. A., Ramaswamy, S., Ross, K., Huber, W. E., Nishimura, E. K., Golub, T. R., & Fisher, D. E. (2004). Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell*, 6(6), 565–576. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2004.10.014>
- Eddy, S. R. (2001). Non-coding RNA genes and the modern RNA world. *Nature Reviews. Genetics*, 2(12), 919–929. <https://doi.org/10.1038/35103511>
- Eguchi, T., Prince, T., Wegiel, B., & Calderwood, S. K. (2015). Role and Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 1 in Cancer. *Journal of Cellular Biochemistry*, 116(10), 2146–2154. <https://doi.org/10.1002/jcb.25203>
- Erdmann, V. A., Barciszewska, M. Z., Hochberg, A., de Groot, N., & Barciszewski, J. (2001). Regulatory RNAs. *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS*, 58(7), 960–977.

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11497242>

- Faião-Flores, F., Alves-Fernandes, D. K., Pennacchi, P. C., Sandri, S., Vicente, A. L. S. A., Scapulatempo-Neto, C., Vazquez, V. L., Reis, R. M., Chauhan, J., Goding, C. R., Smalley, K. S., & Maria-Engler, S. S. (2017). Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells. *Oncogene*, 36(13), 1849–1861. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.348>
- FDA. (n.d.-a). *Compilation of CDER New Molecular Entity (NME) Drug and New Biologic Approvals* / FDA. 2021. Retrieved May 10, 2021, from <https://www.fda.gov/drugs/drug-approvals-and-databases/compilation-cder-new-molecular-entity-nme-drug-and-new-biologic-approvals>
- FDA. (n.d.-b). FDA. Retrieved May 10, 2021, from <https://www.fda.gov/media/94129/download>
- Feinberg, A. (2014). DNA methylation in cancer: three decades of discovery. *Genome Medicine*, 6(5), 36. <https://doi.org/10.1186/gm553>
- Funck-Brentano, E., Hélias-Rodzewicz, Z., Longvert, C., Mokhtari, K., Saiag, P., & Emile, J.-F. (2016). Increase in NRAS mutant allele percentage during metastatic melanoma progression. *Experimental Dermatology*. <https://doi.org/10.1111/exd.13001>
- Furue, M., & Kadono, T. (2016). Melanoma therapy: Check the checkpoints. *The Journal of Dermatology*, 43(2), 121–124. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.13257>
- Gabory, A., Ripoche, M.-A., Le Digarcher, A., Watrin, F., Ziyat, A., Forné, T., Jammes, H., Ainscough, J. F. X., Surani, M. A., Journot, L., & Dandolo, L. (2009). H19 acts as a trans regulator of the imprinted gene network controlling growth in mice. *Development (Cambridge, England)*, 136(20), 3413–3421. <https://doi.org/10.1242/dev.036061>
- Gaggioli, C., & Sahai, E. (2007). Melanoma invasion - Current knowledge and future directions. In *Pigment Cell Research* (Vol. 20, Issue 3, pp. 161–172). Pigment Cell Res. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0749.2007.00378.x>
- Gao, J., Aksoy, B. A., Dogrusoz, U., Dresdner, G., Gross, B., Sumer, S. O., Sun, Y., Jacobsen, A., Sinha, R., Larsson, E., Cerami, E., Sander, C., & Schultz, N. (2013). Integrative analysis of complex cancer genomics and clinical profiles using the cBioPortal. *Science Signaling*, 6(269). <https://doi.org/10.1126/scisignal.2004088>
- Gibb, E. A., Brown, C. J., & Lam, W. L. (2011). The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Molecular Cancer*, 10, 38. <https://doi.org/10.1186/1476-4598-10-38>
- Goding, C. R. (2016). Targeting the lncRNA SAMMSON Reveals Metabolic Vulnerability in Melanoma. In *Cancer Cell* (Vol. 29, Issue 5, pp. 619–621). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.04.010>
- Goedert, L., Pereira, C. G., Roszik, J., Praça, J. R., Cardoso, C., Chen, G., Deng, W., Gopal Yennu-Nanda, V., Silva Jr., W. A., Davies, M. A., & Espreafico, E. M. (2016). RMEL3, a novel BRAF^{V600E}-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. *Oncotarget*, 7(24), 36711–36718. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.9164>
- Gong, C., & Maquat, L. E. (2011). lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature*, 470(7333), 284–288. <https://doi.org/10.1038/nature09701>
- Greger, V., Passarge, E., Höpping, W., Messmer, E., & Horsthemke, B. (1989). Epigenetic changes may contribute to the formation and spontaneous regression of retinoblastoma. *Human Genetics*,

- 83(2), 155–158. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2550354>
- Gruis, N. A., van der Velden, P. A., Sandkuijl, L. A., Prins, D. E., Weaver-Feldhaus, J., Kamb, A., Bergman, W., & Frants, R. R. (1995). Homozygotes for CDKN2 (p16) germline mutation in Dutch familial melanoma kindreds. *Nature Genetics*, 10(3), 351–353. <https://doi.org/10.1038/ng0795-351>
- Grzywa, T. M., Paskal, W., & Włodarski, P. K. (2017). Intratumor and Intertumor Heterogeneity in Melanoma. In *Translational Oncology* (Vol. 10, Issue 6, pp. 956–975). Neoplasia Press, Inc. <https://doi.org/10.1016/j.tranon.2017.09.007>
- GTEX Consortium. (2015). Human genomics. The Genotype-Tissue Expression (GTEx) pilot analysis: multitissue gene regulation in humans. *Science (New York, N.Y.)*, 348(6235), 648–660. <https://doi.org/10.1126/science.1262110>
- Guo, H., Ahmed, M., Zhang, F., Yao, C. Q., Li, S., Liang, Y., Hua, J., Soares, F., Sun, Y., Langstein, J., Li, Y., Poon, C., Bailey, S. D., Desai, K., Fei, T., Li, Q., Sendorek, D. H., Fraser, M., Prensner, J. R., ... He, H. H. (2016). Modulation of long noncoding RNAs by risk SNPs underlying genetic predispositions to prostate cancer. *Nature Genetics*, 48(10), 1142–1150. <https://doi.org/10.1038/ng.3637>
- Guo, Y., Pan, W., Liu, S., Shen, Z., Xu, Y., & Hu, L. (2020). ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Experimental and Therapeutic Medicine*, 19(3), 1997–2007. <https://doi.org/10.3892/etm.2020.8454>
- Gupta, A., Yadav, S., Pt, A., Mishra, J., Samaiya, A., Panday, R. K., & Shukla, S. (2020). The HNRNPA2B1–MST1R–Akt axis contributes to epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck cancer. *Laboratory Investigation*, 100(12), 1589–1601. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-0466-8>
- Gupta, R. A., Shah, N., Wang, K. C., Kim, J., Horlings, H. M., Wong, D. J., Tsai, M. C., Hung, T., Argani, P., Rinn, J. L., Wang, Y., Brzoska, P., Kong, B., Li, R., West, R. B., Van De Vijver, M. J., Sukumar, S., & Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature*, 464(7291), 1071–1076. <https://doi.org/10.1038/nature08975>
- Guttman, M., Amit, I., Garber, M., French, C., Lin, M. F., Feldser, D., Huarte, M., Zuk, O., Carey, B. W., Cassady, J. P., Cabili, M. N., Jaenisch, R., Mikkelsen, T. S., Jacks, T., Hacohen, N., Bernstein, B. E., Kellis, M., Regev, A., Rinn, J. L., & Lander, E. S. (2009). Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature*, 458(7235), 223–227. <https://doi.org/10.1038/nature07672>
- Guttman, M., Donaghey, J., Carey, B. W., Garber, M., Grenier, J. K., Munson, G., Young, G., Lucas, A. B., Ach, R., Bruhn, L., Yang, X., Amit, I., Meissner, A., Regev, A., Rinn, J. L., Root, D. E., & Lander, E. S. (2011). lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature*, 477(7364), 295–300. <https://doi.org/10.1038/nature10398>
- Hänzelmann, S., Castelo, R., & Guinney, J. (2013). GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics*, 14(1), 7. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-14-7>
- Harland, M., Meloni, R., Gruis, N., Pinney, E., Brookes, S., Spurr, N. K., Frischauf, A. M., Bataille, V., Peters, G., Cuzick, J., Selby, P., Bishop, D. T., & Bishop, J. N. (1997). Germline mutations of the CDKN2 gene in UK melanoma families. *Human Molecular Genetics*, 6(12), 2061–2067. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9328469>
- Hélias-Rodzewicz, Z., Funck-Brentano, E., Baudoux, L., Jung, C. K., Zimmermann, U., Marin, C., Clerici, T., Le Gall, C., Peschaud, F., Taly, V., Saiag, P., & Emile, J.-F. (2015). Variations of BRAF mutant

- allele percentage in melanomas. *BMC Cancer*, 15, 497. <https://doi.org/10.1186/s12885-015-1515-3>
- Hemmingsson, O., Zhang, Y., Still, M., & Naredi, P. (2009). ASNA1, an ATPase targeting tail-anchored proteins, regulates melanoma cell growth and sensitivity to cisplatin and arsenite. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 63(3), 491–499. <https://doi.org/10.1007/s00280-008-0762-2>
- Herlyn, M. (1990). Human melanoma: development and progression. *Cancer Metastasis Reviews*, 9(2), 101–112. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2253310>
- Hodis, E., Watson, I. R., Kryukov, G. V., Arold, S. T., Imielinski, M., Theurillat, J.-P., Nickerson, E., Auclair, D., Li, L., Place, C., Dicara, D., Ramos, A. H., Lawrence, M. S., Cibulskis, K., Sivachenko, A., Voet, D., Saksena, G., Stransky, N., Onofrio, R. C., ... Chin, L. (2012). A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell*, 150(2), 251–263. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2012.06.024>
- Hoek, K. S., & Goding, C. R. (2010). Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(6), 746–759. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2010.00757.x>
- Holliday, R., & Pugh, J. E. (1975). DNA modification mechanisms and gene activity during development. *Science (New York, N.Y.)*, 187(4173), 226–232. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1111098>
- Huarte, M. (2015). The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med*, 21(11), 1253–1261. <http://dx.doi.org/10.1038/nm.3981>
- Human Genome Sequencing Consortium International. (2004). Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature*, 431(7011), 931–945. <https://doi.org/10.1038/nature03001>
- Hussein, M. R. (2004). Genetic pathways to melanoma tumorigenesis. *Journal of Clinical Pathology*, 57(8), 797–801. <https://doi.org/10.1136/jcp.2003.015800>
- Hussussian, C. J., Struewing, J. P., Goldstein, A. M., Higgins, P. A., Ally, D. S., Sheahan, M. D., Clark, W. H., Tucker, M. A., & Dracopoli, N. C. (1994). Germline p16 mutations in familial melanoma. *Nature Genetics*, 8(1), 15–21. <https://doi.org/10.1038/ng0994-15>
- Ikeda, H., Lethé, B., Lehmann, F., van Baren, N., Baurain, J. F., de Smet, C., Chambost, H., Vitale, M., Moretta, A., Boon, T., & Coulie, P. G. (1997). Characterization of an antigen that is recognized on a melanoma showing partial HLA loss by CTL expressing an NK inhibitory receptor. *Immunity*, 6(2), 199–208. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9047241>
- INCA. (n.d.). *ESTATISTICA CANCER MELANOMA | INCA - Instituto Nacional de Câncer*. Retrieved May 10, 2021, from <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-pele-melanoma>
- INCA. (2002). *Prevenção e controle do câncer: normas e recomendações do INCA*. 48(3), 317–332.
- INCA. (2014). *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. Coordenação de Prevenção e Vigilância. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>
- Jang, S., & Atkins, M. B. (2013). Which drug, and when, for patients with BRAF-mutant melanoma? *The Lancet. Oncology*, 14(2), e60-9. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(12\)70539-9](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(12)70539-9)
- Jiang, W. G., Sanders, A. J., Katoh, M., Ungefroren, H., Gieseler, F., Prince, M., Thompson, S. K., Zollo, M., Spano, D., Dhawan, P., Sliva, D., Subbarayan, P. R., Sarkar, M., Honoki, K., Fujii, H., Georgakilas, A. G., Amedei, A., Niccolai, E., Amin, A., ... Santini, D. (2015). Tissue invasion and metastasis: Molecular, biological and clinical perspectives. In *Seminars in Cancer Biology* (Vol. 35, pp. S244–S275). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.semcan.2015.03.008>

- Kalal, B. S., Upadhyaya, D., & Pai, V. R. (2017). Chemotherapy resistance mechanisms in advanced skin cancer. In *Oncology Reviews* (Vol. 11, Issue 1, pp. 19–25). Page Press Publications. <https://doi.org/10.4081/oncol.2017.326>
- Karreth, F. A., Tay, Y., Perna, D., Ala, U., Tan, S. M., Rust, A. G., DeNicola, G., Webster, K. A., Weiss, D., Perez-Mancera, P. A., Krauthammer, M., Halaban, R., Provero, P., Adams, D. J., Tuveson, D. A., & Pandolfi, P. P. (2011). In vivo identification of tumor-suppressive PTEN ceRNAs in an oncogenic BRAF-induced mouse model of melanoma. *Cell*, 147(2), 382–395. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.032>
- Khaitan, D., Dinger, M. E., Mazar, J., Crawford, J., Smith, M. a, Mattick, J. S., & Perera, R. J. (2011). The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Research*, 71(11), 3852–3862. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-10-4460>
- Khalil, A. M., Guttman, M., Huarte, M., Garber, M., Raj, A., Rivea Morales, D., Thomas, K., Presser, A., Bernstein, B. E., van Oudenaarden, A., Regev, A., Lander, E. S., & Rinn, J. L. (2009). Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(28), 11667–11672. <https://doi.org/10.1073/pnas.0904715106>
- Kido, K., Sumimoto, H., Asada, S., Okada, S. M., Yaguchi, T., Kawamura, N., Miyagishi, M., Saida, T., & Kawakami, Y. (2009). Simultaneous suppression of MITF and BRAF^{V600E} enhanced inhibition of melanoma cell proliferation. *Cancer Science*, 100(10), 1863–1869. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01266.x>
- Kino, T., Hurt, D. E., Ichijo, T., Nader, N., & Chrousos, G. P. (2010). Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Science Signaling*, 3(107), ra8. <https://doi.org/10.1126/scisignal.2000568>
- Kraemer, K. H. (1997). Sunlight and skin cancer: Another link revealed. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 94(1), 11–14. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.1.11>
- Kraemer, K. H., Lee, M. M., Andrews, A. D., & Lambert, W. C. (1994). The role of sunlight and DNA repair in melanoma and nonmelanoma skin cancer. The xeroderma pigmentosum paradigm. *Archives of Dermatology*, 130(8), 1018–1021. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8053698>
- Krebs, A. M., Mitschke, J., Losada, M. L., Schmalhofer, O., Boerries, M., Busch, H., Boettcher, M., Mougiakakos, D., Reichardt, W., Bronsert, P., Brunton, V. G., Pilarsky, C., Winkler, T. H., Brabletz, S., Stemmler, M. P., & Brabletz, T. (2017). The EMT-activator Zeb1 is a key factor for cell plasticity and promotes metastasis in pancreatic cancer. *Nature Cell Biology*, 19(5), 518–529. <https://doi.org/10.1038/ncb3513>
- Kumar, R., Angelini, S., Czene, K., Sauroja, I., Hahka-Kemppinen, M., Pyrhönen, S., & Hemminki, K. (2003). BRAF mutations in metastatic melanoma: a possible association with clinical outcome. *Clinical Cancer Research : An Official Journal of the American Association for Cancer Research*, 9(9), 3362–3368. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12960123>
- Larsen, J. E., Nathan, V., Osborne, J. K., Farrow, R. K., Deb, D., Sullivan, J. P., Dospoy, P. D., Augustyn, A., Hight, S. K., Sato, M., Girard, L., Behrens, C., Wistuba, I. I., Gazdar, A. F., Hayward, N. K., & Minna, J. D. (2016). ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *Journal of Clinical Investigation*, 126(9), 3219–3235. <https://doi.org/10.1172/JCI76725>
- Lauss, M., Haq, R., Cirenajwis, H., Phung, B., Harbst, K., Staaf, J., Rosengren, F., Holm, K., Aine, M., Jirström, K., Borg, A., Busch, C., Geisler, J., Lønning, P. E., Ringnér, M., Howlin, J., Fisher, D. E., & Jönsson, G. (2015). Genome-wide DNA methylation analysis in melanoma reveals the importance of CpG methylation in MITF regulation. *Journal of Investigative Dermatology*,

- 135(7), 1820–1828. <https://doi.org/10.1038/jid.2015.61>
- Lee, J.-H., Choi, J.-W., & Kim, Y.-S. (2011). Frequencies of BRAF and NRAS mutations are different in histological types and sites of origin of cutaneous melanoma: a meta-analysis. *The British Journal of Dermatology*, 164(4), 776–784. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2133.2010.10185.x>
- Lee, Y.-K., Park, U.-H., Kim, E.-J., Hwang, J.-T., Jeong, J.-C., & Um, S.-J. (2017). Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells. *Cancer Letters*, 403, 144–151. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2017.06.015>
- Leucci, E., Vendramin, R., Spinazzi, M., Laurette, P., Fiers, M., Wouters, J., Radaelli, E., Eyckerman, S., Leonelli, C., Vanderheyden, K., Rogiers, A., Hermans, E., Baatsen, P., Aerts, S., Amant, F., Van Aelst, S., van den Oord, J., de Strooper, B., Davidson, I., ... Marine, J.-C. (2016). Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature*, 531(7595), 518–522. <https://doi.org/10.1038/nature17161>
- Li, F. Z., Dhillon, A. S., Anderson, R. L., McArthur, G., & Ferrao, P. T. (2015a). Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Frontiers in Oncology*, 5, 31. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00031>
- Li, F. Z., Dhillon, A. S., Anderson, R. L., McArthur, G., & Ferrao, P. T. (2015b). Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Frontiers in Oncology*, 5, 31. <https://doi.org/10.3389/fonc.2015.00031>
- Li, J.-H., Liu, S., Zhou, H., Qu, L.-H., & Yang, J.-H. (2014). starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Research*, 42(Database issue), D92–7. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt1248>
- Li, R., Zhang, L., Jia, L., Duan, Y., Li, Y., Bao, L., & Sha, N. (2014). Long Non-Coding RNA BANCR Promotes Proliferation in Malignant Melanoma by Regulating MAPK Pathway Activation. *PloS One*, 9(6), e100893. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100893>
- Li, S., Li, B., Zheng, Y., Li, M., Shi, L., & Pu, X. (2017). Exploring functions of long noncoding RNAs across multiple cancers through co-expression network. *Scientific Reports*, 7(1), 754. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-00856-8>
- Li, T., Xie, J., Shen, C., Cheng, D., Shi, Y., Wu, Z., Deng, X., Chen, H., Shen, B., Peng, C., Li, H., Zhan, Q., & Zhu, Z. (2016). Upregulation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes tumor metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene*, 35(12), 1575–1584. <https://doi.org/10.1038/onc.2015.223>
- Lin, S., Zhang, L., Luo, W., & Zhang, X. (2015). Characteristics of Antisense Transcript Promoters and the Regulation of Their Activity. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(1). <https://doi.org/10.3390/ijms17010009>
- Liu, C., & Lin, J. (2016). Long noncoding RNA ZEB1-AS1 acts as an oncogene in osteosarcoma by epigenetically activating ZEB1. *American Journal of Translational Research*, 8(10), 4095–4105. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27829995>
- Liu, Y., Li, H., Liu, F., Gao, L. Bin, Han, R., Chen, C., Ding, X., Li, S., Lu, K., Yang, L., Tian, H. M., Chen, B. Bin, Li, X., Xu, D. H., Deng, X. L., & Shi, S. L. (2020). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is a negative regulator of human breast cancer metastasis by maintaining the balance of multiple genes and pathways. *EBioMedicine*, 51, 102583. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2019.11.044>
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods*, 25(4), 402–408.

<https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>

- Lonsdale, J., Thomas, J., Salvatore, M., Phillips, R., Lo, E., Shad, S., Hasz, R., Walters, G., Garcia, F., Young, N., Foster, B., Moser, M., Karasik, E., Gillard, B., Ramsey, K., Sullivan, S., Bridge, J., Magazine, H., Syron, J., ... Moore, H. F. (2013). The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat Genet*, 45(6), 580–585. <http://dx.doi.org/10.1038/ng.2653>
- Lv, Q.-L., Hu, L., Chen, S.-H., Sun, B., Fu, M.-L., Qin, C.-Z., Qu, Q., Wang, G.-H., He, C.-J., & Zhou, H.-H. (2016). A Long Noncoding RNA ZEB1-AS1 Promotes Tumorigenesis and Predicts Poor Prognosis in Glioma. *International Journal of Molecular Sciences*, 17(9). <https://doi.org/10.3390/ijms17091431>
- Mackie, R. M., Hauschild, A., & Eggermont, A. M. M. (2009). Epidemiology of invasive cutaneous melanoma. *Annals of Oncology : Official Journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 20 Suppl 6, vi1-7. <https://doi.org/10.1093/annonc/mdp252>
- Mas-Ponte, D., Carlevaro-Fita, J., Palumbo, E., Pulido, T. H., Guigo, R., & Johnson, R. (2017). LncATLAS database for subcellular localization of long noncoding RNAs. *RNA*, 23(7), 1080–1087. <https://doi.org/10.1261/rna.060814.117>
- Matouk, I. J., DeGroot, N., Mezan, S., Ayesh, S., Abu-lail, R., Hochberg, A., & Galun, E. (2007). The H19 Non-Coding RNA Is Essential for Human Tumor Growth. *PLoS ONE*, 2(9), e845. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0000845>
- Mazar, J., Zhao, W., Khalil, A. M., Lee, B., Shelley, J., Govindarajan, S. S., Yamamoto, F., Ratnam, M., Aftab, M. N., Collins, S., Finck, B. N., Han, X., Mattick, J. S., Dinger, M. E., & Perera, R. J. (2014). The functional characterization of long noncoding RNA SPRY4-IT1 in human melanoma cells. In *Oncotarget* (Vol. 5, p. Oncotarget, 5). <http://www.impactjournals.com/oncotarget/index.php?journal=oncotarget&page=article&op=view&path%5B%5D=1863&path%5B%5D=2415>
- McCain, J. (2013). The MAPK (ERK) Pathway: Investigational Combinations for the Treatment Of BRAF-Mutated Metastatic Melanoma. *P & T : A Peer-Reviewed Journal for Formulary Management*, 38(2), 96–108. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3628180&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Meyerson, M., Gabriel, S., & Getz, G. (2010). Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nature Reviews. Genetics*, 11(10), 685–696. <https://doi.org/10.1038/nrg2841>
- Miller, A. J., & Mihm, M. C. (2006). Melanoma. *New England Journal of Medicine*, 355(1), 51–65. <https://doi.org/10.1056/NEJMr052166>
- Morris, K. V., & Mattick, J. S. (2014). The rise of regulatory RNA. *Nature Reviews. Genetics*, 15(6), 423–437. <https://doi.org/10.1038/nrg3722>
- Nagano, T., Mitchell, J. A., Sanz, L. A., Pauler, F. M., Ferguson-Smith, A. C., Feil, R., & Fraser, P. (2008). The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science (New York, N.Y.)*, 322(5908), 1717–1720. <https://doi.org/10.1126/science.1163802>
- Nancarrow, D. J., Mann, G. J., Holland, E. A., Walker, G. J., Beaton, S. C., Walters, M. K., Luxford, C., Palmer, J. M., Donald, J. A., & Weber, J. L. (1993). Confirmation of chromosome 9p linkage in familial melanoma. *American Journal of Human Genetics*, 53(4), 936–942. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682395&tool=pmcentrez&render type=abstract>

- Nie, L., Wu, H.-J., Hsu, J.-M., Chang, S.-S., Labaff, A. M., Li, C.-W., Wang, Y., Hsu, J. L., & Hung, M.-C. (2012). Long non-coding RNAs: versatile master regulators of gene expression and crucial players in cancer. *American Journal of Translational Research*, 4(2), 127–150. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3353529&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- O'Brien, J., Hayder, H., Zayed, Y., & Peng, C. (2018). Overview of microRNA biogenesis, mechanisms of actions, and circulation. In *Frontiers in Endocrinology* (Vol. 9, Issue AUG, p. 402). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00402>
- Oehler, V. G., Guthrie, K. A., Cummings, C. L., Sabo, K., Wood, B. L., Gooley, T., Yang, T., Epping, M. T., Shou, Y., Pogosova-Agadjanyan, E., Ladne, P., Stirewalt, D. L., Abkowitz, J. L., & Radich, J. P. (2009). The preferentially expressed antigen in melanoma (PRAME) inhibits myeloid differentiation in normal hematopoietic and leukemic progenitor cells. *Blood*, 114(15), 3299–3308. <https://doi.org/10.1182/blood-2008-07-170282>
- Ohno, S. (1972). So much “junk” DNA in our genome. *Brookhaven Symposia in Biology*, 23, 366–370. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5065367>
- Ossowski, L., & Aguirre-Ghiso, J. A. (2010). Dormancy of metastatic melanoma. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 23(1), 41–56. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2009.00647.x>
- Pawlikowski, J. S., McBryan, T., van Tuyn, J., Drotar, M. E., Hewitt, R. N., Maier, A. B., King, A., Blyth, K., Wu, H., & Adams, P. D. (2013). Wnt signaling potentiates nevogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110(40), 16009–16014. <https://doi.org/10.1073/pnas.1303491110>
- Pei, Y., & Tuschl, T. (2006). On the art of identifying effective and specific siRNAs. *Nature Methods*, 3(9), 670–676. <https://doi.org/10.1038/nmeth911>
- Peters, T. J., Buckley, M. J., Statham, A. L., Pidsley, R., Samaras, K., V Lord, R., Clark, S. J., & Molloy, P. L. (2015). De novo identification of differentially methylated regions in the human genome. *Epigenetics & Chromatin*, 8, 6. <https://doi.org/10.1186/1756-8935-8-6>
- Petty, E. M., Gibson, L. H., Fountain, J. W., Bolognia, J. L., Yang-Feng, T. L., Housman, D. E., & Bale, A. E. (1993). Molecular definition of a chromosome 9p21 germ-line deletion in a woman with multiple melanomas and a plexiform neurofibroma: implications for 9p tumor-suppressor gene(s). *American Journal of Human Genetics*, 53(1), 96–104. <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1682234&tool=pmcentrez&render type=abstract>
- Prensner, J. R., & Chinnaiyan, A. M. (2011). The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discovery*, 1(5), 391–407. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-11-0209>
- Qin, N., Wang, C., Lu, Q., Ma, Z., Dai, J., Ma, H., Jin, G., Shen, H., & Hu, Z. (2017). Systematic identification of long non-coding RNAs with cancer-testis expression patterns in 14 cancer types. *Oncotarget*, 8(55), 94769–94779. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21930>
- Quinlan, A. R., & Hall, I. M. (2010). BEDTools: a flexible suite of utilities for comparing genomic features. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 26(6), 841–842. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq033>
- Raveh, E., Matouk, I. J., Gilon, M., & Hochberg, A. (2015). The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. *Molecular Cancer*, 14, 184. <https://doi.org/10.1186/s12943-015-0458-2>
- Reinhard Dummer, Mark R. Pittelkow, Keiji Iwatsuki, Adèle Green, N. M. E. (2011). *Skin Cancer - A*

- World-Wide Perspective* (R. Dummer, M. R. Pittelkow, K. Iwatsuki, A. Green, & N. M. Elwan (Eds.)). Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-05072-5>
- Richard, G., Dalle, S., Monet, M.-A., Ligier, M., Boespflug, A., Pommier, R. M., de la Fouchardière, A., Perier-Muzet, M., Depaepe, L., Barnault, R., Tondeur, G., Ansieau, S., Thomas, E., Bertolotto, C., Ballotti, R., Mourah, S., Battistella, M., Lebbé, C., Thomas, L., ... Caramel, J. (2016). ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Molecular Medicine*, 8(10), 1143–1161. <https://doi.org/10.15252/emmm.201505971>
- Riefolo, M., Porcellini, E., Dika, E., Broseghini, E., & Ferracin, M. (2019). Interplay between small and long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: a complex jigsaw puzzle with missing pieces. In *Molecular Oncology* (Vol. 13, Issue 1, pp. 74–98). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/1878-0261.12412>
- Robinson, M. D., McCarthy, D. J., & Smyth, G. K. (2009). edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics*, 26(1), 139–140. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp616>
- Salmena, L., Poliseno, L., Tay, Y., Kats, L., & Pandolfi, P. P. (2011). A ceRNA hypothesis: the Rosetta Stone of a hidden RNA language? *Cell*, 146(3), 353–358. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.07.014>
- Sanchez-Tillo, E., de Barrios, O., Siles, L., Amendola, P. G., Darling, D. S., Cuatrecasas, M., Castells, A., & Postigo, A. (2013). ZEB1 Promotes Invasiveness of Colorectal Carcinoma Cells through the Opposing Regulation of uPA and PAI-1. *Clinical Cancer Research*, 19(5), 1071–1082. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-12-2675>
- Sandri, S., Faião-Flores, F., Tiago, M., Pennacchi, P. C., Massaro, R. R., Alves-Fernandes, D. K., Berardinelli, G. N., Evangelista, A. F., de Lima Vazquez, V., Reis, R. M., & Maria-Engler, S. S. (2016). Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacological Research*, 111, 523–533. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.07.017>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J. Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. In *Nature Methods* (Vol. 9, Issue 7, pp. 676–682). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmitt, A. M., & Chang, H. Y. (2016). Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. In *Cancer Cell* (Vol. 29, Issue 4, pp. 452–463). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2016.03.010>
- Shen, Y., Feng, Y., Li, F., Jia, Y., Peng, Y., Zhao, W., Hu, J., & He, A. (2021). LncRNA ST3GAL6-AS1 promotes invasion by inhibiting hnRNPA2B1-mediated ST3GAL6 expression in multiple myeloma. *International Journal of Oncology*, 58(4), 1–1. <https://doi.org/10.3892/ijo.2021.5185>
- Siegel, R. L., Miller, K. D., Fuchs, H. E., & Jemal, A. (2021). Cancer Statistics, 2021. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(1), 7–33. <https://doi.org/10.3322/caac.21654>
- Siena, Á. D. D., Praça, J. R., Araújo, L. F., de Barros, I. I., Peronni, K., Molfetta, G., de Biagi, C. A. O., Espreafico, E. M., Sousa, J. F., & Silva, W. A. (2019). Whole transcriptome analysis reveals correlation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 with invasive profile in melanoma. *Scientific Reports*, 9(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-47363-6>
- Sleutels, F., Zwart, R., & Barlow, D. P. (2002). The non-coding Air RNA is required for silencing autosomal imprinted genes. *Nature*, 415(6873), 810–813. <https://doi.org/10.1038/415810a>

- Sproul, D., Kitchen, R. R., Nestor, C. E., Dixon, J. M., Sims, A. H., Harrison, D. J., Ramsahoye, B. H., & Meehan, R. R. (2012). Tissue of origin determines cancer-associated CpG island promoter hypermethylation patterns. *Genome Biology*, 13(10), R84. <https://doi.org/10.1186/gb-2012-13-10-r84>
- Su, W., Xu, M., Chen, X., Chen, N., Gong, J., Nie, L., Li, L., Li, X., Zhang, M., & Zhou, Q. (2017). Long noncoding RNA ZEB1-AS1 epigenetically regulates the expressions of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer. *Molecular Cancer*, 16(1), 142. <https://doi.org/10.1186/s12943-017-0711-y>
- Sumazin, P., Yang, X., Chiu, H.-S., Chung, W.-J., Iyer, A., Llobet-Navas, D., Rajbhandari, P., Bansal, M., Guarnieri, P., Silva, J., & Califano, A. (2011). An extensive microRNA-mediated network of RNA-RNA interactions regulates established oncogenic pathways in glioblastoma. *Cell*, 147(2), 370–381. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.041>
- Tang, L., Zhang, W., Su, B., & Yu, B. (2013). Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *BioMed Research International*, 2013, 251098. <https://doi.org/10.1155/2013/251098>
- Tang, Z., Kang, B., Li, C., Chen, T., & Zhang, Z. (2019). GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Research*, 47(W1), W556–W560. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz430>
- Tang, Z., Li, C., Kang, B., Gao, G., Li, C., & Zhang, Z. (2017). GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses. *Nucleic Acids Research*, 45(W1), W98–W102. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx247>
- Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A., & Conesa, A. (2011). Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Research*, 21(12), 2213–2223. <https://doi.org/10.1101/gr.124321.111>
- Tay, Y., Kats, L., Salmena, L., Weiss, D., Tan, S. M., Ala, U., Karreth, F., Poliseno, L., Provero, P., Di Cunto, F., Lieberman, J., Rigoutsos, I., & Pandolfi, P. P. (2011). Coding-independent regulation of the tumor suppressor PTEN by competing endogenous mRNAs. *Cell*, 147(2), 344–357. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2011.09.029>
- Tripathi, V., Ellis, J. D., Shen, Z., Song, D. Y., Pan, Q., Watt, A. T., Freier, S. M., Bennett, C. F., Sharma, A., Bubulya, P. A., Blencowe, B. J., Prasanth, S. G., & Prasanth, K. V. (2010). The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Molecular Cell*, 39(6), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>
- Tsai, M.-C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J. K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E., & Chang, H. Y. (2010). Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5992), 689–693. <https://doi.org/10.1126/science.1192002>
- Tufarelli, C., Stanley, J. A. S., Garrick, D., Sharpe, J. A., Ayyub, H., Wood, W. G., & Higgs, D. R. (2003). Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nature Genetics*, 34(2), 157–165. <https://doi.org/10.1038/ng1157>
- Wang, C., Gu, Y., Zhang, K., Xie, K., Zhu, M., Dai, N., Jiang, Y., Guo, X., Liu, M., Dai, J., Wu, L., Jin, G., Ma, H., Jiang, T., Yin, R., Xia, Y., Liu, L., Wang, S., Shen, B., ... Hu, Z. (2016). Systematic identification of genes with a cancer-testis expression pattern in 19 cancer types. *Nature Communications*, 7, 10499. <https://doi.org/10.1038/ncomms10499>
- Wang, Z.-L., Zhang, X.-Q., Zhou, H., Yang, J.-H., & Qu, L.-H. (2017). oncoNcRNA: A Web Portal for Exploring the Non-Coding RNAs with Oncogenic Potentials in Human Cancers. *Non-Coding RNA*,

3(1), 7. <https://doi.org/10.3390/ncrna3010007>

- Wang, Z., Yang, B., Zhang, M., Guo, W., Wu, Z., Wang, Y., Jia, L., Li, S., Cancer Genome Atlas Research Network, S. J., Xie, W., Yang, D., Kasapi, M., Ferguson, M. L., Hutter, C. M., Sofia, H. J., Tarnuzzer, R., Wang, Z., Yang, L., Zenklusen, J. C., ... Yang, D. (2018). lncRNA Epigenetic Landscape Analysis Identifies EPIC1 as an Oncogenic lncRNA that Interacts with MYC and Promotes Cell-Cycle Progression in Cancer. *Cancer Cell*, 33(4), 706–720.e9. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.03.006>
- Warden, C. (2014). *COHCAP Analysis of CpG Island Methylation for Illumina 450k Methylation Arrays*.
- Warden, C. D., Lee, H., Tompkins, J. D., Li, X., Wang, C., Riggs, A. D., Yu, H., Jove, R., & Yuan, Y.-C. (2013). COHCAP: an integrative genomic pipeline for single-nucleotide resolution DNA methylation analysis. *Nucleic Acids Research*, 41(11), e117–e117. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt242>
- Wei, Y., Sun, Q., Zhao, L., Wu, J., Chen, X., Wang, Y., Zang, W., & Zhao, G. (2016). lncRNA UCA1-miR-507-FOXO1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma. *Medical Oncology*, 33(8), 88. <https://doi.org/10.1007/s12032-016-0804-2>
- Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H., & Schaidt, H. (2011). Transcriptional Activation of ZEB1 by Slug Leads to Cooperative Regulation of the Epithelial–Mesenchymal Transition-Like Phenotype in Melanoma. *Journal of Investigative Dermatology*, 131(9), 1877–1885. <https://doi.org/10.1038/jid.2011.142>
- Whitman, T., Vanbroeklin, M. W., Russo, M. E., Haak, P. T., Bilgili, D., Resau, J. H., Koo, H.-M., & Holmen, S. L. (2007). Differential oncogenic potential of activated RAS isoforms in melanocytes. *Oncogene*, 26(31), 4563–4570. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1210239>
- Widmer, D. S., Cheng, P. F., Eichhoff, O. M., Belloni, B. C., Zipser, M. C., Schlegel, N. C., Javelaud, D., Mauviel, A., Dummer, R., & Hoek, K. S. (2012). Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 25(3), 343–353. <https://doi.org/10.1111/j.1755-148X.2012.00986.x>
- Wu, H., Goel, V., & Haluska, F. G. (2003). PTEN signaling pathways in melanoma. *Oncogene*, 22(20), 3113–3122. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206451>
- Wu, S. C., Kallin, E. M., & Zhang, Y. (2010). Role of H3K27 methylation in the regulation of lncRNA expression. *Cell Research*, 20(10), 1109–1116. <https://doi.org/10.1038/cr.2010.114>
- Yu, P. F., Kang, A. R., Jing, L. J., & Wang, Y. M. (2018). Long non-coding RNA CACNA1G-AS1 promotes cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by HNRNP A2B1 in non-small cell lung cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, 22(4), 993–1002. https://doi.org/10.26355/eurev_201802_14381
- Zhang, B., Kirov, S., & Snoddy, J. (2005). WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Research*, 33(Web Server), W741–W748. <https://doi.org/10.1093/nar/gki475>
- Zhang, J., Chiodini, R., Badr, A., & Zhang, G. (2011). The impact of next-generation sequencing on genomics. *Journal of Genetics and Genomics = Yi Chuan Xue Bao*, 38(3), 95–109. <https://doi.org/10.1016/j.jgg.2011.02.003>
- Zhang, K., Luo, Z., Zhang, Y., Zhang, L., Wu, L., Liu, L., Yang, J., Song, X., & Liu, J. (2016). Circulating lncRNA H19 in plasma as a novel biomarker for breast cancer. *Cancer Biomarkers*, 17(2), 187–194. <https://doi.org/10.3233/CBM-160630>

- Zhang, P., Sun, Y., & Ma, L. (2015). ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle (Georgetown, Tex.)*, 14(4), 481–487. <https://doi.org/10.1080/15384101.2015.1006048>
- Zuo, L., Weger, J., Yang, Q., Goldstein, A. M., Tucker, M. A., Walker, G. J., Hayward, N., & Dracopoli, N. C. (1996). Germline mutations in the p16INK4a binding domain of CDK4 in familial melanoma. *Nature Genetics*, 12(1), 97–99. <https://doi.org/10.1038/ng0196-97>

8. APÊNDICE

8.1. Artigos resultantes deste estudo

8.1.1. Manuscrito publicado em 2019

Whole transcriptome analysis reveals correlation of long noncoding RNA *ZEB1-AS1* with invasive profile in melanoma

Ádamo Davi Diógenes Siena^{1,3}, Jéssica Rodrigues Praça^{3,4}, Luiza Ferreira Araújo^{1,3,4}, Isabela Ichihara Barros^{1,3}, Kamila Peronni Zueli³, Greice Andreotti de Molfetta^{1,3,5}, Carlos Alberto Oliveira de Biagi Júnior^{1,3}, Enilza Maria Espreafico², Josane Freitas Sousa^{3,4}, Wilson Araújo Silva Jr^{1,3,4,5} *

¹Department of Genetics at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

²Department of Cellular and Molecular Biology at Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

³Center for Cell-Based Therapy (CEPID/FAPESP); National Institute of Science and Technology in Stem Cell and Cell Therapy (INCTC/CNPq), Regional Blood Center of Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, Brazil.

⁴Center for Integrative Systems Biology (CISBi) – NAP/USP. Ribeirão Preto, Brazil.

⁵Center for Medical Genomics, HCFMRP/USP, Ribeirão Preto, Brazil.

*Corresponding author

E-mail address: wilsonjr@usp.br

ABSTRACT

Melanoma is the deadliest form of skin cancer, and little is known about the impact of deregulated expression of long noncoding RNAs (lncRNAs) in the progression of this cancer. In this study, we explored RNA-Seq data to search for lncRNAs associated with melanoma progression. We found distinct lncRNA gene expression patterns across melanocytes, primary and metastatic melanoma cells. Also, we observed upregulation of the lncRNA *ZEB1-AS1* (*ZEB1* antisense RNA 1) in melanoma cell lines. Data analysis from The Cancer Genome Atlas (TCGA) confirmed higher *ZEB1-AS1* expression in metastatic melanoma and its association with hotspot mutations in *BRAF* (B-Raf proto-oncogene, serine/threonine kinase) gene and *RAS* family genes. In addition, a positive correlation between *ZEB1-AS1* and *ZEB1* (zinc finger E-box binding homeobox 1) gene expression was verified in primary and metastatic melanomas. Using gene expression signatures indicative of invasive or proliferative phenotypes, we found an association between *ZEB1-AS1* upregulation and a transcriptional profile for invasiveness. Enrichment analysis of correlated genes demonstrated cancer genes and pathways associated with *ZEB1-AS1*. We suggest that the lncRNA *ZEB1-AS1* could function by activating *ZEB1* gene expression, thereby influencing invasiveness and phenotype switching in melanoma, an epithelial-to-mesenchymal transition (EMT)-like process, which the *ZEB1* gene has an essential role.

Introduction

Melanoma is the most lethal form of skin cancer. Although it comprises only 5% of skin cancers, it corresponds to 80% of patient deaths¹. While trends for most cancers have been declining worldwide, the incidence of melanoma has risen in the last decades². Melanoma progression strongly impacts on patient lifespan, with the 5-year survival rate decreasing from 98% of patients with local melanoma to only 16% of patients with distant melanoma^{3,4}. As for other cancers, metastasis is the main cause of melanoma deaths, making detection of early disease, when curative resection is possible, considered the most effective treatment.

Currently, the tumour, lymph node, metastasis (TNM) staging system does not provide an accurate prognosis for melanoma³, reflecting the need to identify biomarkers⁵ with better diagnostic and staging and predictive values. Furthermore, the identification of molecules and mechanisms to confront melanoma development has improved rapidly in the last decades and could in the future provide a new source of treatment strategies. Recent genomic studies have identified a functionally diverse class of noncoding RNAs, defined as long noncoding RNAs (lncRNAs)⁶, which has been associated with gene regulatory functions. These molecules are transcripts longer than 200 nucleotides lacking protein-coding capacity. They are versatile molecules involved in gene expression regulation by diverse interactions with DNA, RNA and/or proteins^{7,8}. Studies on lncRNAs expression patterns and function have demonstrated enough evidence of their key role in developmental processes⁹ and diseases¹⁰, including many cancers¹¹. In melanoma, lncRNAs have recently been associated with important biological features, such as proliferation^{12–14}, invasion^{15,16} and apoptosis^{17,18}, however details of their influence on melanoma development are still missing.

Previous findings of our laboratory demonstrated the influence of the lncRNA *HOTAIR* (HOX transcript antisense RNA) in stemness and epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) in cancer¹⁹. The EMT process is a highly conserved critical step for embryogenesis and melanocyte lineage differentiation. Importantly, reactivation of EMT in many epithelial cancers is common and implicated in the loss of cell polarity and cell-to-cell adhesion, cytoskeleton reorganization and gaining of mesenchymal-like morphology, including the ability of migration^{20,21}. A similar process has been observed in melanoma progression, in which melanocytic cells can reversibly change their status towards a more mesenchymal-like state^{22,23}. This melanoma “phenotype switching” model is concordant with gene expression profiling studies, which demonstrated two alternating phenotypic profiles switching from a rapidly proliferative/low invasive condition to slower proliferative/highly migratory with high invasive potential²⁴. Remarkably, proliferative melanoma samples express high levels of *MITF* (melanocyte inducing transcription factor), *SOX10* (SRY-box 10) and *PAX3* (paired box 3) genes^{22,25,26}. In contrast, samples with invasive phenotype demonstrate low levels of *MITF* and high expression of *ZEB1* and *TGFB1* (transforming growth factor beta) pathway genes^{27,28}. Recently, it was confirmed that the melanoma proliferative phenotype is regulated by *SOX10/MITF* and that *AP1/TEADs* are regulators of the invasive phenotype²⁹. Although several protein-coding genes involved in melanoma phenotype switching have been characterized, the role of noncoding genes in this process remains poorly understood.

Herein, we performed RNA sequencing (RNA-Seq) and downloaded public data to search for lncRNAs associated with melanoma progression. Differential gene expression analysis revealed lncRNA *ZEB1-AS1* upregulation in melanoma in comparison to normal melanocytes. Importantly, significantly higher levels of *ZEB1-AS1* were detected in metastatic melanoma when compared with primary melanoma. Using GSVA (Gene Set Variation Analysis), we found a significant correlation between *ZEB1-AS1* expression and a melanoma invasive transcriptional signature. Our study provides

insights into the *ZEB1-AS1* relationship with melanoma progression and suggests its contribution to *ZEB1* regulation, which in turn influences melanoma phenotype switching.

Results

Overview of RNA-Seq data from melanocytes and melanoma cell lines

We performed RNA-Seq in melanocytic cell lines (melanocytes=1, primary melanoma=5, and metastatic melanoma=3). Subsequently, we downloaded raw public data (melanocyte=1, primary melanoma=1, and metastatic melanoma=6) from a previous study³⁰ and assembled all data into a single dataset for subsequent genome mapping and analysis. We obtained read mapping efficiency of 64,39% on average (Supplementary Table S1). Figure 1a shows the number of genes in the human transcriptome per range of mapped reads from the dataset. To avoid non-biological overrepresentation of reads detected and to allow further transcriptome characterization, we only considered a gene being expressed when it presented at least five mapped reads, as previously applied by Tarazona *et al.* (2011)³¹. As expected, we detected expression of a lower number of lncRNAs in comparison to protein-coding genes in the total transcriptome for each cell line (Fig. 1d). When exploring data for exclusive and common transcripts, the highest number of genes expressed exclusively in a group was found in primary melanoma cell lines (PRIM), which presented a total of 4276 genes, of which 1730 were lncRNA genes. Transcripts exclusively expressed in melanocyte cell lines (MELC) represented a total of 433 genes, of which 184 were lncRNA genes. Besides, metastatic melanoma cell lines (MET) exclusive transcripts represented a total of 1255 genes, of which 490 were lncRNAs genes (Fig. 1b and Fig. 1c). According to the GENCODE lncRNA biotypes classification, the two predominant categories in our dataset were antisense (n=976) and long intergenic non-coding RNAs – lincRNAs (n=972) genes. Although being the most frequently detected, the median expression level of lncRNAs in those two biotypes categories were not higher than that from lncRNAs in other categories (Fig. 1e).

Differential gene expression analysis between melanocytes and primary and metastatic melanoma cell lines

For data quality control and to check cell lines disparities, we performed Principal Component Analysis (PCA). We detected two major clusters distinct from each other, which consists of melanoma (including primary and metastatic) cell lines and melanocyte cell lines (Fig. 2a). We next evaluated differentially expressed genes to detect genes deregulated at different melanoma stages. The analysis comparing melanocytes and metastatic melanoma cell lines (MELC x MET) presented 593 differentially expressed genes, of which 47 were lncRNA genes, including 32 upregulated and 15 downregulated in metastatic melanoma (Fig. 2b). The comparison between melanocytes and primary tumour melanoma cell lines (MELC x PRIM) revealed 295 differentially expressed genes, of which 29 were lncRNA genes, including 16 upregulated and 13 downregulated in primary tumour melanoma cell lines (Fig. 2c). Analysis of primary tumour versus metastatic melanoma cell lines (PRIM x MET) presented 28 differentially expressed genes including five lncRNA genes, all of them downregulated in the metastatic stage (Fig. 2d). We further analyzed expression patterns of differentially expressed genes by unsupervised hierarchical clusterization. We found that melanocytes always clustered together in a distinct manner away from melanoma samples, based either on the total transcriptome (Fig. 2e) or only on the lncRNA gene set (Fig. 2f). However, a better separation between the primary and metastatic melanoma cell lines was achieved when performing clusterization based on the lncRNA gene set only.

The lncRNA *ZEB1-AS1* is upregulated in both primary and metastatic melanoma cell lines in comparison to melanocytes

To further investigate deregulated lncRNA genes, we then selected top upregulated lncRNAs genes according to their Fold Change (FC) values. Pursuing the characterization of lncRNAs potentially associated with both melanoma development and metastatic spread, we prioritised candidates that were deregulated in both comparisons (MELC x PRIM and MELC x MET). The lncRNA with the highest differential expression in both comparisons (MELC x PRIM and MELC x MET) was the recently characterized melanoma-specific lncRNA *SAMMSON*¹⁸. Similarly, we found the frequently cancer deregulated lncRNA *H19*³² amongst the top differentially expressed lncRNAs in our comparisons (see Tables 1 and 2). The third lncRNA most upregulated in primary melanoma cell lines in comparison to melanocytes was *ZEB1-AS1*, which is located in the opposite strand of gene *ZEB1*. Importantly, the lncRNA *ZEB1-AS1* was also amongst the top five lncRNAs upregulated in metastatic melanoma cell lines when compared to melanocytes. The *ZEB1-AS1* persistence as a deregulated lncRNA in different comparisons, as well as the fact that *ZEB1* gene (that we also found upregulated in melanoma cell lines in comparison to melanocytes) is known to contribute to EMT and cancer progression, lead us to prioritize *ZEB1-AS1* for further analysis. Interestingly, in the melanoma cell lines, our analysis revealed a robust positive correlation between *ZEB1-AS1* and *ZEB1* expression levels (Supplementary Figure S1).

Expression levels of lncRNA *ZEB1-AS1* and *ZEB1* gene are positively correlated in melanoma tumours and associated with frequent melanoma mutations.

According to normal tissue data available in the GTEx (Genotype-Tissue Expression) database³³, *ZEB1-AS1* is a ubiquitously expressed lncRNA, with a tissue distribution pattern similar to *ZEB1* transcription factor (Supplementary Figure S2 and S3). We then evaluated the *ZEB1-AS1* expression in cutaneous melanoma samples (Skin Cutaneous Melanoma - SKCM) from the TCGA data. *ZEB-AS1* expression showed a strong positive correlation with *ZEB1* mRNA in both primary melanoma (Fig. 3a, $r=0.66$ and $P\text{-value}<2.9\text{E-}14$) and metastatic melanoma (Fig. 3b, $r=0.52$ and $P\text{-value}<2.2\text{E-}16$) samples. Although melanoma presented lower levels of *ZEB1-AS1* expression in comparison to other tumours (Supplementary Figure S4), significantly higher levels of *ZEB1-AS1* ($P\text{-value}<0.0001$) were found in metastasis in comparison to primary melanomas (Fig. 3c). Also, we evaluated the molecular subtypes defined by the TCGA Network analysis³⁴. Melanoma samples carrying *BRAF* or *RAS* mutations presented significantly higher expression levels of *ZEB1-AS1* ($P\text{-value}<0.001$ and $P\text{-value}<0.05$, respectively) when compared to the Triple Wild-Type group (Fig. 3d). Comparatively, *ZEB1* gene demonstrated higher expression ($P\text{-value}<0.001$) only in the *BRAF* group (Fig. 3e).

Association between lncRNA *ZEB1-AS1* gene expression with melanoma invasive phenotype

It has been proposed that during tumour progression melanoma cells switch between a proliferative and an invasive state³⁵. Specific gene expression signatures had been associated with each one of these phenotypic states²². Using GSVA and the proliferative or the invasive gene signatures we scored each melanoma cell line and each of the tumours sample from the TCGA database for both phenotypic states, based on their expression profile (RNA-Seq data). Then, we evaluated the correlation between *ZEB1-AS1* or *ZEB1* expression levels and the proliferative or invasive scores. Our results revealed that in melanoma cell lines, *ZEB1-AS1* expression presents a robust positive correlation with the invasive score (Fig. 4b, $r=0.67$, and $P=0.0033$) and is inversely correlated with the proliferative score (Fig. 4a, $r=-0.71$, and $P=0.0013$). Similar results were observed for *ZEB1* gene expression, with even higher positive correlation with the invasive score (Fig. 4d, $r=0.79$, and $P=0.00019$) and higher negative correlation with the proliferative score (Fig. 4c, $r=-0.82$,

and $P=5.1E-05$). It is interesting to note that melanocytes, which have the lowest expression levels of *ZEB1* and *ZEB1-AS1*, presented the highest proliferative score and the lowest invasive score values when compared to other melanoma cell lines. Likewise, analysis in the TCGA data set showed *ZEB1-AS1* and *ZEB1* expressions positively correlated with the invasive score and inversely correlated with the proliferative score in both primary and metastatic melanoma samples (Fig. 4e-h).

Functional annotation of *ZEB1-AS1* correlated genes in melanoma

To gain insights on the biological pathways being regulated by *ZEB1-AS1* in melanoma, we searched the RNA-Seq data from melanomas in the TCGA database for genes positively or negatively correlated with *ZEB1-AS1* expression (correlated genes). This analysis revealed 2059 Positively Correlated genes (PC, Pearson $r \geq 0.3$ and P -value < 0.01) and 116 Negatively Correlated genes (NC, Pearson $r \leq -0.3$ and P -value < 0.01) with *ZEB1-AS1* expression (see Supplementary file S1 and S2). Comparatively, the same analysis for *ZEB1* gene demonstrated 1617 PC genes and 242 NC genes (Supplementary file S3 and S4). We performed pathway enrichment analysis according to Gene Ontology (see also Supplementary Figure S5) or Reactome annotations for the genes correlated (positively or negatively) with *ZEB1-AS1* expression. In biological process, positively correlated genes in the top enriched pathways included transcriptional regulation, RNA processing and cilium organization/assembly (Fig. 5). For the negative correlated genes, top-ranked biological processes were mostly associated to ion transport and intracellular pH regulation (Fig. 5).

Discussion

In recent years, gene expression and transcriptome analysis revealed lncRNAs with aberrant expression in tumour progression and many evidences support their key role in multiple cancers^{36,37}. Also, it has been demonstrated that lncRNAs present lower expression levels and are more tissue-specific than protein-coding genes, even for cancer-related lncRNAs^{38–40}. We revealed that lncRNAs gene expression produces a more consistent pattern of discrimination between melanocytes and both primary and metastatic melanoma cell lines. These results demonstrate the value of lncRNA profiling as a better way to distinguish the different stages (normal melanocytes, primary tumours and metastasis) of melanoma development.

Among the top ten upregulated lncRNAs in either primary or metastatic melanoma cell lines in comparison to melanocytes we found *ZEB1-AS1*. Previous studies reported the involvement of *ZEB1-AS1* in different cancers, but no skin cancer associations until now⁴¹. *ZEB1-AS1* upregulation was first reported in hepatocellular carcinoma and associated with poor prognosis and tumour growth and metastasis⁴². Interestingly, epigenetic studies demonstrated mechanistic variance according to different tumours. *Liu and Lin* (2016), suggested that *ZEB1-AS1* directly binds and recruits the histone acetyltransferase P300 (E1A binding protein P300) to the *ZEB1* promoter region, activating *ZEB1* transcription and resulting in poor prognosis in osteosarcoma⁴³. On the other hand, *Su et al.* (2017), showed that *ZEB1-AS1* binds and recruits *MLL1* (mixed lineage leukemia protein-1) to *ZEB1* promoter region, inducing H3K4me3 modification and activating *ZEB1* transcription⁴⁴. Until now, lncRNA *ZEB1-AS1* has not been associated with melanoma and invasiveness, although there is significant evidence of *ZEB1* influence in EMT and melanoma development^{28,45}. For the first time, we demonstrated lncRNA *ZEB1-AS1* upregulation in melanoma cell lines and reported significantly higher expression of this lncRNA in metastatic melanomas in comparison to primary tumours using TCGA data. In addition, we confirmed prior expectations of *ZEB1* and *ZEB1-AS1* positive correlation expression in melanoma as previously reported in some cancers^{42,44}. Moreover, our analysis also

increased the findings associated with this positive correlation according to normal tissues or tumours analysed (Supplementary Files S7 and S8, respectively).

Next-generation sequencing studies have identified genetic mutations that provide insights into melanoma heterogeneity, which could have implications in determining patient prognosis or targeted therapy^{46–48}. Previous characterization of TCGA samples according to mutational status was utilized to identify higher expression of *ZEB1-AS1* in the *BRAF* and *RAS* mutant groups. Since both genes are found within the MAPK pathway, our findings could suggest a role of *ZEB1-AS1* in the MAPK pathway regulatory network³⁴. Indeed, a recent study has suggested that resistance to MAPK inhibitors in melanoma could be due to cell plasticity mediated by high levels of *ZEB1* gene expression⁴⁹.

As expected, by reported induction of *ZEB1* by *ZEB1-AS1*⁴², we tested well-established gene signatures association with an invasive or proliferative phenotype of melanomas⁵⁰. We showed a positive correlation between higher levels of *ZEB1-AS1* and the invasive profile in melanoma cell lines and tumours. Conversely, there was a significant negative correlation with the proliferative profile score of melanocytic cells. This suggests the association of *ZEB1* and *ZEB1-AS1* with the phenotype switching in melanoma, towards the invasive phenotype. It was interesting to note that normal melanocytes demonstrated the highest scores for the proliferative profile and highest negative correlation with *ZEB-AS1*. The high proliferative score detected in cultured melanocytes is probably associated with the presence in those cells of a melanocytic cell lineage program coordinated by specific regulators such as *MITF* gene. This gene codified a transcription factor fundamental to differentiation and development of melanocytic cell lineage and associated with the proliferative profile of melanoma cells⁵¹. In this sense, the crucial role of *MITF* besides determining embryonic melanocyte fate includes regulation of downstream genes involved in cell cycle progression such as *CDK2*⁵² (cyclin dependent kinase 2) and cell proliferation inducers as *DIAPH1*⁵³ (diaphanous related formin 1). In fact, it is suggested that *MITF* regulatory potential in normal endogenous levels stimulate proliferation while down or overexpression inhibits cell proliferation competence⁵⁴.

Although the role of *ZEB1*, and other key transcription factors, in promoting invasion and malignant progression in many cancers^{55–57} is well established, associations of lncRNAs and invasiveness and tumour development still need more research. We observed a positive association between *ZEB1-AS1* expression with the invasive phenotype in melanoma tumours. In addition, *ZEB1-AS1* expression levels positively correlated with several genes involved in transcription regulation, indicative of a role in transcriptional reprogramming, a central process for phenotype switching. An example of a gene in this pathway is the transcription factor *MZF1* (myeloid zinc finger 1) gene. This gene is known to contribute to malignancy and invasion in many tumours⁵⁸. Indeed, it has been recently associated with *PRAME* (preferentially expressed antigen of melanoma) upregulation and colony formation, which is associated with metastatic potential in melanoma cell line studies⁵⁹. Also, interestingly, genes involved in cilium formation were considered enriched among the genes positively correlated with *ZEB1-AS1* in melanomas. Although the loss of primary cilia has been more frequently implicated in the development of melanoma⁶⁰ and other cancers⁶¹, a recent study unveiled primary ciliogenesis as a key mechanism by which EMT programs induce stemness in a specific subset (claudin-low subtype) of breast tumours⁶². In this sense, it would be interesting to investigate whether *ZEB1-AS1* has any role on the regulation of primary cilium formation and if this regulation may affect melanoma development and invasion in general or in a subset of melanoma tumours.

The association of *ZEB1-AS1* expression with melanoma invasion profile is certainly dependent in part of *ZEB1* function. However, our analysis pointed out also for a *ZEB1* independent

role of this lncRNA on the transcriptional regulation, since 82,1% of the positively and 25% of the negatively correlated genes with *ZEB1-AS1* were not shared with *ZEB1*. Despite *ZEB1* gene being known as a transcriptional repressor, our data analysis supports *ZEB-AS1* as a positive modulator of gene expression⁶³, like some antisense lncRNAs have been described to act like⁶⁴.

In summary, we firstly identified lncRNA *ZEB1-AS1* upregulation in melanoma when compared with melanocytes and metastatic tumours in comparison to primary melanomas. In addition, we showed an association between *ZEB1-AS1* expression levels with *BRAF/RAS* status and with an invasive phenotype in melanoma and suggested this lncRNA directly or indirectly regulates potential genes and pathways. These findings support the notion of an important function of *ZEB1-AS1*, which may act with some independence of *ZEB1*, in melanoma progression and melanoma phenotype switching. To this date, lncRNAs interactions with diverse molecules have proved to be an essential aspect as modulators of cancer phenotypes⁶⁵. Altogether, these evidences and our findings reinforce the need for further functional analysis, including the characterization of mechanistically associated molecules, of *ZEB1-AS1* in melanoma progression.

Methods

Cell culture

Primary melanoma (WM35, WM1552, WM278, WM793 and WM1789) and metastatic melanoma (1205lu, WM1617 and WM852) cell lines were maintained in conditions of 5% CO₂ atmosphere and temperature of 37°C. These cell lines were grown in TU growth medium (80% of MCDB-153 medium, 20% of Leibovitz's L-15 medium, 5µg/mL of Insulin and 1.6 mM of CaCl₂) and supplemented with 2% Fetal Bovine Serum (Gibco). We also used a melanocyte cell line (FM308) previously obtained from neonate foreskin which was grown in medium 254CF (Thermo Fischer Scientific) and maintained in similar conditions, as previously utilised by Sousa & Espreafico (2008)⁶⁶ and Araujo *et al.* (2018)⁶⁷. All cell lines utilized in this work were tested for mycoplasma infection.

RNA extraction

Total RNA was extracted with AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (Qiagen) following the manufacturer's instructions. Density and purity of RNA were tested by the ratio 260/280 nm measurement in NanoDrop (Thermo Fischer Scientific). RNA quality was tested by Agilent Bioanalyzer, which generates an RNA Integrity Number (RIN) between 1 (more degraded) and 10 (least degraded) and only samples with threshold RIN ≥7 were utilized in this study.

Library construction and RNA sequencing

RNA fragments sized 200-500 bp (base pairs) obtained by fragmentation were utilized to generate sequencing libraries using TruSeq Stranded Total RNA LT Sample Prep Kit (Illumina Inc). The RiboZero technology (Illumina Inc) was utilized to remove abundant rRNA and keep both poly(A) and non-poly(A) transcripts. Clustering was made in an automated system cBot (Illumina Inc), and samples were sequenced with TruSeq SBS kit v5, single-read 72 cycles in Genome Analyzer IIx equipment (Illumina Inc). All reagents were utilized following manufacturer's usage protocols.

Public raw data and pre-processing

Raw sequencing data from melanocyte (MC502), primary melanoma (A375) and metastatic melanoma cell lines (A2058, C32, MALME3M, SKMEL28, SKMEL5, and WM2664) were downloaded

from Gene Expression Omnibus (GEO), under access number GSE46818. Then, the data was converted to compatible *fastq* format file using the SRA Toolkit (http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Traces/sra/sra.cgi?view=toolkit_doc&f=fastq-dump), and quality control was tested using FastQC (Babraham Bioinformatics).

Transcriptome mapping, annotation and quantification

All data were mapped and quantified by STAR v2.5⁶⁸. We considered a count feature as a count read per gene while mapping, as package default parameters from STAR, and quantifications were displayed as CPM (Counts Per Million) for cell lines. The lncRNA gene annotations were downloaded from GENCODE Release 25 (GRCh38). Therefore, different biotypes of lncRNAs were categorized according to those provided from the long noncoding genes annotation in the GTF file.

Data normalization and differential gene expression analysis

Public and in house-generated RNA-Seq data were normalized using the default method Trimmed Mean of M-values (TMM) to avoid bias effects. To detect differentially expressed lncRNAs, edgeR package version 3.16.5 from Bioconductor in R statistical platform was used. We considered differentially expressed genes in analysis with adjusted *P*-values < 0.05 and Fold Change (FC) ≤ -2 or ≥ 2 for down and up-regulated genes, respectively.

TCGA data analysis and mutational classification of melanoma samples

TCGA gene expression data was downloaded directly from the TCGA portal and via UCSC repository (xenabrowser.net). TCGA samples were matched by barcode and divided into four main groups according to presence or not of mutations established by genomic molecular classification of melanoma provided by TCGA team³⁴. This classification relied on the division of SKCM according to the presence of melanoma hotspot mutations (*BRAF*, *NF1* and *RAS* family group) or their absence (Triple Wild-Type).

Gene Set Variation Analysis and melanoma proliferative/invasive gene expression signatures

Gene Set Variation Analysis (GSVA)⁶⁹ allowed us to define an enrichment score (ES) that represents the degree of enrichment of a gene set in each sample within a given dataset⁷⁰. Based on the systematic classification of melanoma by phenotype-specific gene expression profile⁵⁰, we retrieved melanoma gene expression signatures associated with either invasive (n=45 genes, Supplementary file S5) or proliferative status (n=52 genes, Supplementary file S6). Accordingly, we evaluated the correlation between either *ZEB1* or *ZEB1-AS1* expression with the proliferative or invasive ES presented by melanoma cell lines and TCGA melanoma tumours.

Correlated genes, Gene Ontology and KEGG analysis

Pearson's correlation coefficient was calculated between lncRNA *ZEB1-AS1* and each other gene in melanoma samples from the TCGA. Genes significantly correlated ($r \leq -0.3$ or $r \geq 0.3$ and *P*-value < 0.01) were submitted to functional annotation in Gene Ontology (GO) terms for biological processes (BP), cellular components (CC), and molecular function (MF). Then, top-ranked GO terms were displayed according to the highest number of genes assigned. Positive and negative *ZEB1-AS1* correlated genes were also submitted to pathway enrichment analysis using Reactome database. Both analyses were performed using the WEB-based Gene SeT Analysis Toolkit (WebGestalt)⁷¹.

Statistical analysis

Statistical tests and plots were calculated and generated using R platform and PRISM V.6.01 (GraphPad Software, La Jolla California USA).

Data Availability

The datasets generated during the current study are available in the SRA database repository, under SRA accession PRJNA530784 (www.ncbi.nlm.nih.gov/sra/PRJNA530784).

REFERENCES

1. Miller, A. J. & Mihm, M. C. Melanoma. *N. Engl. J. Med.* **355**, 51–65 (2006).
2. Siegel, R., Ma, J., Zou, Z. & Jemal, A. Cancer statistics, 2014. *CA. Cancer J. Clin.* **64**, 9–29 (2014).
3. Sandru, A., Voinea, S., Panaitescu, E. & Blidaru, A. Survival rates of patients with metastatic malignant melanoma. *J. Med. Life* **7**, 572–6 (2014).
4. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures. (2014).
5. Dickson, P. V & Gershenwald, J. E. Staging and prognosis of cutaneous melanoma. *Surg. Oncol. Clin. N. Am.* **20**, 1–17 (2011).
6. Mercer, T. R., Dinger, M. E. & Mattick, J. S. Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 155–159 (2009).
7. Guttman, M. & Rinn, J. L. Modular regulatory principles of large non-coding RNAs. *Nature* **482**, 339–346 (2012).
8. Wang, K. C. & Chang, H. Y. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol. Cell* **43**, 904–14 (2011).
9. Fatica, A. & Bozzoni, I. Long non-coding RNAs: new players in cell differentiation and development. *Nat. Rev. Genet.* **15**, 7–21 (2013).
10. Maass, P. G., Luft, F. C. & Bähring, S. Long non-coding RNA in health and disease. *J. Mol. Med. (Berl)*. **92**, 337–46 (2014).
11. Prensner, J. R. & Chinnaiyan, A. M. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov.* **1**, 391–407 (2011).
12. Li, R. *et al.* Long Non-Coding RNA BANC1 Promotes Proliferation in Malignant Melanoma by Regulating MAPK Pathway Activation. *PLoS One* **9**, e100893 (2014).
13. Goedert, L. *et al.* RMEL3, a novel BRAF^{V600E}-associated long noncoding RNA, is required for MAPK and PI3K signaling in melanoma. *Oncotarget* **7**, 36711–36718 (2016).
14. 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.* **33**, 88 (2016).
15. Tang, L., Zhang, W., Su, B. & Yu, B. Long noncoding RNA HOTAIR is associated with motility, invasion, and metastatic potential of metastatic melanoma. *Biomed Res. Int.* **2013**, 251098 (2013).
16. Chen, L. *et al.* lncRNA GAS5 is a critical regulator of metastasis phenotype of melanoma cells and inhibits tumor growth in vivo. *Onco. Targets. Ther.* **9**, 4075–87 (2016).

17. Khaitan, D. *et al.* The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res.* **71**, 3852–62 (2011).
18. Leucci, E. *et al.* Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMMSON. *Nature* **531**, 518–522 (2016).
19. Pádua Alves, C. *et al.* Brief report: The lincRNA Hotair is required for epithelial-to-mesenchymal transition and stemness maintenance of cancer cell lines. *Stem Cells* **31**, 2827–32 (2013).
20. Fenouille, N. *et al.* The epithelial-mesenchymal transition (EMT) regulatory factor SLUG (SNAI2) is a downstream target of SPARC and AKT in promoting melanoma cell invasion. *PLoS One* **7**, e40378 (2012).
21. Larue, L. & Bellacosa, A. Epithelial–mesenchymal transition in development and cancer: role of phosphatidylinositol 3' kinase/AKT pathways. *Oncogene* **24**, 7443–7454 (2005).
22. Hoek, K. S. *et al.* In vivo Switching of Human Melanoma Cells between Proliferative and Invasive States. *Cancer Res.* **68**, 650–656 (2008).
23. Hoek, K. S. & Goding, C. R. Cancer stem cells versus phenotype-switching in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **23**, 746–759 (2010).
24. Hoek, K. S. *et al.* Metastatic potential of melanomas defined by specific gene expression profiles with no BRAF signature. *Pigment Cell Res.* **19**, 290–302 (2006).
25. Shakhova, O. *et al.* Sox10 promotes the formation and maintenance of giant congenital naevi and melanoma. *Nat. Cell Biol.* **14**, 882–890 (2012).
26. Scholl, F. A. *et al.* PAX3 is expressed in human melanomas and contributes to tumor cell survival. *Cancer Res.* **61**, 823–6 (2001).
27. Caramel, J. *et al.* A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
28. Wels, C., Joshi, S., Koefinger, P., Bergler, H. & Schaidler, H. Transcriptional Activation of ZEB1 by Slug Leads to Cooperative Regulation of the Epithelial–Mesenchymal Transition-Like Phenotype in Melanoma. *J. Invest. Dermatol.* **131**, 1877–1885 (2011).
29. Verfaillie, A. *et al.* Decoding the regulatory landscape of melanoma reveals TEADS as regulators of the invasive cell state. *Nat. Commun.* **6**, 6683 (2015).
30. Pawlikowski, J. S. *et al.* Wnt signaling potentiates nevogenesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **110**, 16009–14 (2013).
31. Tarazona, S., García-Alcalde, F., Dopazo, J., Ferrer, A. & Conesa, A. Differential expression in RNA-seq: a matter of depth. *Genome Res.* **21**, 2213–23 (2011).
32. Raveh, E., Matouk, I. J., Gilon, M. & Hochberg, A. The H19 Long non-coding RNA in cancer initiation, progression and metastasis - a proposed unifying theory. *Mol. Cancer* **14**, 184 (2015).
33. Lonsdale, J. *et al.* The Genotype-Tissue Expression (GTEx) project. *Nat. Genet.* **45**, 580–5 (2013).
34. Akbani, R. *et al.* Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* **161**, 1681–1696 (2015).
35. Li, F. Z., Dhillon, A. S., Anderson, R. L., McArthur, G. & Ferrao, P. T. Phenotype switching in melanoma: implications for progression and therapy. *Front. Oncol.* **5**, 31 (2015).

36. Huarte, M. The emerging role of lncRNAs in cancer. *Nat Med* **21**, 1253–1261 (2015).
37. Gibb, E. A., Brown, C. J. & Lam, W. L. The functional role of long non-coding RNA in human carcinomas. *Mol. Cancer* **10**, 38 (2011).
38. Derrien, T. *et al.* The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* **22**, 1775–89 (2012).
39. Li, S. *et al.* Exploring functions of long noncoding RNAs across multiple cancers through co-expression network. *Sci. Rep.* **7**, 754 (2017).
40. Guo, H. *et al.* Modulation of long noncoding RNAs by risk SNPs underlying genetic predispositions to prostate cancer. *Nat. Genet.* **48**, 1142–1150 (2016).
41. Li, J. *et al.* ZEB1-AS1: A crucial cancer-related long non-coding RNA. *Cell Prolif.* **51**, e12423 (2018).
42. Li, T. *et al.* Upregulation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 promotes tumor metastasis and predicts poor prognosis in hepatocellular carcinoma. *Oncogene* **35**, 1575–1584 (2016).
43. Liu, C. & Lin, J. Long noncoding RNA ZEB1-AS1 acts as an oncogene in osteosarcoma by epigenetically activating ZEB1. *Am. J. Transl. Res.* **8**, 4095–4105 (2016).
44. Su, W. *et al.* Long noncoding RNA ZEB1-AS1 epigenetically regulates the expressions of ZEB1 and downstream molecules in prostate cancer. *Mol. Cancer* **16**, 142 (2017).
45. Caramel, J. *et al.* A Switch in the Expression of Embryonic EMT-Inducers Drives the Development of Malignant Melanoma. *Cancer Cell* **24**, 466–480 (2013).
46. Berger, M. F. *et al.* Melanoma genome sequencing reveals frequent PREX2 mutations. *Nature* **485**, 502–6 (2012).
47. Hodis, E. *et al.* A landscape of driver mutations in melanoma. *Cell* **150**, 251–63 (2012).
48. de Unamuno Bustos, B. *et al.* Towards Personalized Medicine in Melanoma: Implementation of a Clinical Next-Generation Sequencing Panel. *Sci. Rep.* **7**, 495 (2017).
49. Richard, G. *et al.* ZEB1-mediated melanoma cell plasticity enhances resistance to MAPK inhibitors. *EMBO Mol. Med.* **8**, 1143–1161 (2016).
50. Widmer, D. S. *et al.* Systematic classification of melanoma cells by phenotype-specific gene expression mapping. *Pigment Cell Melanoma Res.* **25**, 343–353 (2012).
51. Levy, C., Khaled, M. & Fisher, D. E. MITF: master regulator of melanocyte development and melanoma oncogene. *Trends Mol. Med.* **12**, 406–414 (2006).
52. Du, J. *et al.* Critical role of CDK2 for melanoma growth linked to its melanocyte-specific transcriptional regulation by MITF. *Cancer Cell* **6**, 565–576 (2004).
53. Carreira, S. *et al.* Mitf regulation of Dia1 controls melanoma proliferation and invasiveness. *Genes Dev.* **20**, 3426–39 (2006).
54. Kido, K. *et al.* Simultaneous suppression of MITF and BRAF^{V600E} enhanced inhibition of melanoma cell proliferation. *Cancer Sci.* **100**, 1863–1869 (2009).
55. Sanchez-Tillo, E. *et al.* ZEB1 Promotes Invasiveness of Colorectal Carcinoma Cells through the Opposing Regulation of uPA and PAI-1. *Clin. Cancer Res.* **19**, 1071–1082 (2013).
56. Larsen, J. E. *et al.* ZEB1 drives epithelial-to-mesenchymal transition in lung cancer. *J. Clin. Invest.* **126**, 3219–3235 (2016).

57. Zhang, P., Sun, Y. & Ma, L. ZEB1: at the crossroads of epithelial-mesenchymal transition, metastasis and therapy resistance. *Cell Cycle* **14**, 481–7 (2015).
58. Eguchi, T., Prince, T., Wegiel, B. & Calderwood, S. K. Role and Regulation of Myeloid Zinc Finger Protein 1 in Cancer. *J. Cell. Biochem.* **116**, 2146–2154 (2015).
59. Lee, Y.-K. *et al.* Tumor antigen PRAME is up-regulated by MZF1 in cooperation with DNA hypomethylation in melanoma cells. *Cancer Lett.* **403**, 144–151 (2017).
60. Zingg, D. *et al.* EZH2-Mediated Primary Cilium Deconstruction Drives Metastatic Melanoma Formation. *Cancer Cell* **34**, 69–84.e14 (2018).
61. Cao, M. & Zhong, Q. Cilia in autophagy and cancer. *Cilia* **5**, 4 (2015).
62. Guen, V. J. *et al.* EMT programs promote basal mammary stem cell and tumor-initiating cell stemness by inducing primary ciliogenesis and Hedgehog signaling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **114**, E10532–E10539 (2017).
63. Koirala, P. *et al.* LncRNA AK023948 is a positive regulator of AKT. *Nat. Commun.* **8**, 14422 (2017).
64. Zong, X. *et al.* Natural antisense RNA promotes 3' end processing and maturation of MALAT1 lncRNA. *Nucleic Acids Res.* **44**, 2898–2908 (2016).
65. Schmitt, A. M. & Chang, H. Y. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* **29**, 452–463 (2016).
66. Sousa, J. F. & Espreafico, E. M. Suppression subtractive hybridization profiles of radial growth phase and metastatic melanoma cell lines reveal novel potential targets. *BMC Cancer* **8**, 19 (2008).
67. Araujo, L. F. *et al.* Mitochondrial transcription factor A (TFAM) shapes metabolic and invasion gene signatures in melanoma. *Sci. Rep.* **8**, 14190 (2018).
68. Dobin, A. *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* **29**, 15–21 (2013).
69. Hänzelmann, S., Castelo, R. & Guinney, J. GSEA: gene set variation analysis for microarray and RNA-Seq data. *BMC Bioinformatics* **14**, 7 (2013).
70. Barbie, D. A. *et al.* Systematic RNA interference reveals that oncogenic KRAS-driven cancers require TBK1. *Nature* **462**, 108–12 (2009).
71. Zhang, B., Kirov, S. & Snoddy, J. WebGestalt: an integrated system for exploring gene sets in various biological contexts. *Nucleic Acids Res.* **33**, W741–W748 (2005).

Author contributions

A.D.D.S. designed and performed experiments, performed data and bioinformatics analysis, prepared figures and drafted the manuscript. L.F.A., I.I.B., K.P.Z., G.A.M. performed experiments. J.R.P. and C.A.O.B.J. performed bioinformatics and statistical analysis. E.M.E. helped in the design of experiments and reviewed the manuscript. J.F.S. and W.A.S.J. designed experiments and drafted the manuscript. All authors reviewed the final manuscript.

Competing Interests

The authors declare no competing interests.

Corresponding author

Correspondence to Wilson Araujo Silva Jr (wilsonjr@usp.br).

Figure legends

Figure 1. Overview of transcriptome data analysis. **a.** Boxplot showing the number of all genes detected within regular range of mapped count reads in assembled RNA-Seq data. **b.** Venn diagram showing transcriptome common and exclusive expressed genes (with mapped reads ≥ 5) in melanocytes (433 genes), primary melanoma (4276 genes) and metastatic melanoma (1255 genes) cell lines. **c.** Venn diagram showing only shared and exclusive lncRNAs expressed (with mapped reads ≥ 5) in melanocytes (184 lncRNAs genes), primary melanoma (1730 lncRNAs genes) and in metastatic melanoma (490) cell lines. **d.** Characterization of transcriptome composition showing lncRNAs and other genes expressed (with mapped reads ≥ 5) in melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. **e.** Boxplot showing lncRNA biotypes according to GENCODE classification in melanoma progression groups (only considering genes with mapped reads ≥ 5). Middle lines in boxplot represent median.

Figure 2. PCA and deregulated expressed genes in melanocyte and melanoma. **a.** PCA plot showing disparities of melanocytes and melanoma cell lines. Each colour represents a cell line group and shapes represent different runs from the two RNA-Seq data sources. **b.** Volcano plot showing deregulated lncRNAs in MELC x MET, including upregulated (red dots) and downregulated (green dots) lncRNAs in metastatic melanoma (MET) in comparison with melanocyte (MELC). **c.** Volcano plot showing deregulated lncRNAs in MELC x PRIM, including upregulated (red dots) and downregulated (green dots) lncRNAs in primary melanoma (PRIM) in comparison with melanocyte (MELC). **d.** Volcano plot showing deregulated lncRNAs in PRIM x MET, with only downregulated lncRNAs (green dots) in metastatic melanoma (MET) in comparison with primary melanoma (PRIM). **e,f.** Hierarchical clusterization using Euclidean distance of all differentially expressed genes and considering only differentially expressed lncRNA genes, respectively.

Figure 3. Analysis of *ZEB1* and *ZEB1-AS1* gene expression in TCGA melanoma samples. **a,b.** High positive correlation between *ZEB1* and *ZEB1-AS1* expression in primary melanoma and metastatic melanoma samples, respectively. Analysis from Pearson's statistical test. Grey band represents the confidence interval. **c.** Graph showing higher expression of *ZEB1-AS1* in metastatic melanoma compared to primary melanoma samples from SKCM TCGA. T-test analysis was used. **d,e.** Boxplot showing expression levels of *ZEB1-AS1* or *ZEB1*, respectively, across different mutational groups of melanoma. Statistics based on ANOVA test. *P*-values statistical significance labels: * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$, **** $P \leq 0.0001$.

Figure 4. *ZEB1* and *ZEB1-AS1* association with invasive phenotype. **a,c.** Correlation plots showing negative correlation between *ZEB1-AS1* or *ZEB1* expression levels with melanocytic cell lines proliferative score, respectively. **b,d.** Correlation plots showing positive correlation of *ZEB1-AS1* or *ZEB1* expression levels with melanocytic cell lines invasive score, respectively. **e,g.** Correlation plots showing negative correlation between *ZEB1-AS1* or *ZEB1* expression levels with proliferative score in SKCM TCGA samples, respectively. **f,h.** Correlation plots showing positive correlation between *ZEB1*-

AS1 or *ZEB1* expression levels with invasive score in SKCM TCGA samples, respectively. Grey band corresponds to confidence interval.

Figure 5. Gene Ontology (GO) and Reactome enrichment analysis showing top-10 ranked GO terms for *ZEB1-AS1* correlated genes. Bar plots showing the number of significant genes for enriched Biological Process and Reactome pathways analysis, respectively. Red bars: *ZEB1-AS1* negatively correlated genes (Pearson $r \leq -0.03$). Blue bars: *ZEB1-AS1* positively correlated genes (Pearson $r \geq 0.03$).

Table 1 - Top 10 lncRNAs upregulated in primary melanoma cell lines in comparison to melanocytes

GENE ID	GENE NAME	LOGFC	ADJ. P-VALUE	GENE TYPE
ENSG00000240405.5	<i>SAMMSON</i>	10,23	5,93E-05	lincRNA
ENSG00000130600.16	<i>H19</i>	9,56	4,76E-04	processed transcript
ENSG00000237036.4	<i>ZEB1-AS1</i>	8,91	1,48E-07	antisense
ENSG00000268812.3	<i>RP1-102K2.8</i>	8,02	2,81E-05	antisense
ENSG00000271857.1	<i>RP1-244F24.1</i>	7,88	1,02E-04	antisense
ENSG00000220891.1	<i>LL22NC03-63E9.3</i>	7,55	7,64E-04	antisense
ENSG00000231528.2	<i>FAM225A</i>	7,34	1,18E-04	lincRNA
ENSG00000257497.2	<i>RP11-585P4.5</i>	7,25	2,31E-04	antisense
ENSG00000272872.1	<i>LL22NC03-N14H11.1</i>	6,97	5,74E-04	sense intronic
ENSG00000206195.10	<i>DUXAP8</i>	6,74	2,83E-09	processed transcript

Table 2 - Top 10 lncRNAs upregulated in metastatic melanoma cell lines in comparison to melanocytes.

GENE ID	GENE NAME	LOGFC	ADJ. P-VALUE	GENE TYPE
ENSG00000240405.5	<i>SAMMSON</i>	10,06	6,60E-05	lincRNA
ENSG00000272068.1	<i>RP11-284F21.9</i>	10,54	1,42E-04	lincRNA
ENSG00000260604.2	<i>RP1-140K8.5</i>	9,86	1,36E-03	lincRNA
ENSG00000244300.2	<i>GATA2-AS1</i>	9,75	1,26E-03	antisense
ENSG00000130600.16	<i>H19</i>	9,06	7,44E-04	processed transcript
ENSG00000237036.4	<i>ZEB1-AS1</i>	8,95	8,68E-08	antisense
ENSG00000259153.1	<i>RP6-65G23.3</i>	8,76	6,79E-04	lincRNA
ENSG00000282057.1	<i>RP4-621F18.2</i>	8,65	8,85E-04	lincRNA
ENSG00000272502.1	<i>RP11-713M15.2</i>	8,42	5,63E-05	antisense
ENSG00000204860.4	<i>FAM201A</i>	8,29	8,24E-04	antisense

Fig. 1

Fig. 2

Fig. 3

Fig. 4

Fig. 5

8.1.2. Manuscrito submetido para publicação em 2021

Downregulation of the novel lncRNA U731166 is associated with migration, invasion, and Vemurafenib resistance in melanoma.

Authors: Ádamo Davi Diógenes Siena^{1,2}, Isabela Ichihara de Barros^{1,2}, Camila Baldin Storti^{1,2}, Carlos Alberto Oliveira de Biagi Júnior^{1,2}, Larissa Anastacio da Costa Carvalho³, Silvy Stuchi Maria-Engler³, Josane de Freitas Sousa⁴, Wilson Araújo Silva Jr^{1,2,5,6}.

Author's institutional affiliations

¹Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

²Center for Cell Based Therapy, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, Brazil.

³Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil.

⁴Institute of Biological Sciences, Federal University of Para (UFPA), Belém, PA, Brazil.

⁵Center for Integrative Systems Biology-CISBi, NAP/USP, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil.

⁶Department of Medicine at the Midwest State University of Paraná (UNICENTRO) and Guarapuava Institute for Cancer Research, Cidade dos Lagos, Guarapuava, PR, Brazil.

Abstract

Our previous work using a melanoma progression model composed of melanocytic cells (melanocytes, primary and metastatic melanoma samples) demonstrated various deregulated genes, including a few known lncRNAs. Further analysis was conducted to discover novel lncRNAs associated with melanoma, and candidates were prioritized for their potential association with invasiveness or other metastasis-related processes. In this sense, we found the intergenic lncRNA U73166 (ENSG00000230454) and decided to explore its effects in melanoma. For that, we silenced the lncRNA U73166 expression using shRNAs in a melanoma cell line. Next, we experimentally investigated its functions and found that migration and invasion had significantly decreased in knockdown cells, indicating an essential association of lncRNA U73166 for cancer processes. Additionally, using naïve and Vemurafenib-resistant cell lines and data from a patient before and after resistance, we found that Vemurafenib-resistant samples had a higher expression of lncRNA U73166. Also, we retrieved data from the literature that indicates lncRNA U73166 may act as a mediator of RNA processing and cell invasion, probably inducing a more aggressive phenotype. Therefore, our results suggest a relevant role of lncRNA U73166 in metastasis development. We also pointed herein the lncRNA U73166 as a new possible biomarker or target to help overcome clinical vemurafenib resistance.

Keywords

Melanoma, lncRNAs, Invasion, Migration, Vemurafenib, Resistance, U73166, ENSG00000230454

Introduction

Skin cancer is the most common cancer globally, and melanoma is the highly lethal form of this cancer type. Melanoma arises from melanocytes that lost growth and replication control, and it can be defined according to each progression phase they present at the moment in tumoral development.^{1, 2} Although it has shown a concerning increased incidence in most countries in the last decades, this issue has been addressed in recent years and resulted in decline rates in the most prevalent regions, such as Australia and Northern America, mainly due to public policy campaigns and new therapies, respectively.^{3–5} However, in 2021 considering only the United States, it is expected 101,280 new cases of melanoma in situ of the skin, which is estimated at 7,180 cases resulting in melanoma cancer deaths.⁶

Cutaneous melanoma can show different subtype classifications that can be more broadly defined if they arise in skin areas with or without chronic sun-induced damage¹ or, more specifically, for example, according to mutations that patients can harbor in their cells.⁷ This molecular subtype stratification of patients is significant because about 50% of melanoma patients have a mutation in the BRAF gene.^{8–10} Another reason for BRAF relevance in melanoma is that from all BRAF-mutants individuals, about 90% harbor the specific V600E mutation^{11–13} which activates the MAPK-ERK pathway constitutively, allowing cells to become self-sufficient in growth signals and leading to tumor formation.^{14, 15}

The BRAFV600E relevance in melanoma is also reflected in drugs that have been investigated to target this mutation. The first widely used BRAF-mutant inhibitor is known as Vemurafenib and it initially has demonstrated promising results, reducing the risk of death and tumor progression by 63% and 74%, respectively.¹¹ However, the main obstacles regarding Vemurafenib exclusive treatment are the primary resistance that accounts for 20% of the cases and acquired drug resistance.^{16, 17} These mechanisms of drug resistance in melanoma are mainly due to the MAPK reactivation with or without the PI3K/AKT pathway activation.¹⁸ Currently, a combination of strategies targeting melanoma is the leading and most used option on which clinicians can base their patients' management decisions, considering the patient's clinical aspects, specific mutations, and other biological tumoral features.^{19, 20}

In the last decades, increasing interest in biomarkers and gene therapy using nucleic acids to treat melanoma has revealed its potential application to therapeutics. Small non-coding RNAs (sncRNAs) were the leading topic of research for many years.^{21–24} This research field

using sncRNAs was improved by developing technologies like microarray profiling, real-time PCR array, and next-generation sequencing (NGS) technologies.²⁵

More recently, long noncoding RNAs (lncRNAs) have begun to be extensively studied and demonstrated a high potential to be used as biomarkers in many cancers and can be helpful for cancer patient management.²⁶ The lncRNAs are generally defined as RNA molecules that are 200 nucleotides long and have no protein-coding ability.²⁷ They are expressed in a tissue-specific manner, participate in a myriad of critical cellular functions and have been implicated as mediators in distinct disease pathogenesis.²⁸ In cancer, lncRNAs have initially been pointed out as deregulated transcripts whose expression levels impact normal processes, but recently, they have been associated with functionally relevant alterations in critical cancer processes and pathways.²⁹ Therefore, lncRNAs demonstrated an enormous potential to be explored and used as a biomarker in cancer research.^{30, 31}

An increasing number of novel lncRNAs have been revealed in melanoma, demonstrating their contributions to tumor development. Notably, many of them have great potential to be used as biomarkers and even as therapeutic targets.³² They have been implicated in diverse cancer aspects in melanoma as proliferation,³³ invasion,³⁴ metastasis,³⁵ migration,³⁶ apoptosis,³⁴ and other tumoral processes. Another reason for the importance of this class of transcripts in melanomagenesis is that they can be more expressed in specific melanoma samples, making them putative biomarker molecules of specific biological aspects regarding melanoma development and staging.³⁷

This study explored our previous RNA-Seq results and found that the novel lncRNA was U73166 deregulated and associated with an invasive profile in melanoma. Moreover, we experimentally verified these findings, and we found that silencing lncRNA U73166 impacts migration, invasion, and proliferation in melanoma cells. Our further analysis found an association between the lncRNA U73166 expression and acquired resistance to Vemurafenib, suggesting that this lncRNA may play an essential role in melanoma resistance.

Material and methods

Melanocytic cell lines and normal tissue gene expression analysis

Melanoma cell lines were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium – DMEM (SK-MEL-147, SK-MEL-5, A375, SK-MEL-28) supplemented with 10% (v/v) inactivated fetal

bovine serum – FBS (Gibco) or in TU medium (4/5 of MCDB-153 medium and 1/5 of Leibovitz's L-15 medium) supplemented with 5 µg/mL of Insulin, 2 mM of CaCl₂ and 2% FBS (WM164, WM35, WM1552, WM902, WM278, WM793, WM9, WM1617, WM852, 1205lu). Primary melanocytes (MELC 80, MELC 124, MELC 125, and MELC 126) were obtained from patient's foreskins from the University Hospital (Hospital Universitário – HU-USP). To this end, the project has undergone review and approval by the Ethics Committee of HU (HU no. CEP Case 943/09). These melanocytes were maintained in 254CF medium (Thermo Fischer Scientific), supplemented with HMGS solution (Thermo Fischer Scientific), 200 µM calcium chloride, and 2% FBS.

To obtain Vemurafenib-resistant cell lines, we used A375, SK-MEL-28, and WM164 cell lines seeded at a low cell density (1×10^4 cells) in a 60 mm plate, according to Sandri *et al.*, (2016).³⁸ Then, these cell lines were treated with increasing doses of Vemurafenib in the range of 0.5-6 µM every three days for a maximum of 6 weeks. It is important to mention that the vemurafenib resistance was previously validated in these cell lines by western blotting and it was confirmed the MAPK pathway reactivation - MEK and ERK phosphorylation levels in Vemurafenib presence.^{38, 39} These cells were named naïve and resistant cells. The resistant cell lines were continuously refilled with 6 µM Vemurafenib every 2-3 days.

For the lncRNA U73166 expression analysis in normal tissues, we utilized the Human Total RNA Master Panel II (Clontech). The ready-to-use RNA was converted to cDNA, and subsequent analysis was carried similarly to RNAs extracted from cell lines and detailed below.

All utilized cells were incubated at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO₂ and were tested for mycoplasma infection.

RNA-Seq, public data, and invasive or proliferative score

We utilized Gene Set Variation Analysis (GSVA) and specific gene expression profile signatures for each phenotype (invasion or proliferation) to define an enrichment score in our samples. Then, we evaluated the association of the lncRNA U73166 gene expression and these enrichment scores. Our analysis was performed in our previous RNA-Seq experiment and public TCGA data from melanoma samples, as detailed in our work.⁴⁰

To check gene expression patterns, lncRNA U73166 was screened in several TCGA tumors and GTEx normal tissues via Gene Expression Profiling Interactive Analysis

(GEPIA2).⁴¹ Also, GEPIA2 was utilized to explore gene expression correlation between lncRNA U73166 and RBFOX2, HNRNPA2B1, and SRSF1. To identify RNA-binding proteins experimentally tested that interact with lncRNA U73166, we utilized CLIP-Seq data obtained from starBase v2.0 platform.⁴²

RNA extraction and reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR)

Total RNA was isolated from cell lines using miRNeasy Mini Kit (QIAGEN) and treated with RQ1 RNase-Free DNase (Promega). Then, RNA quantification and control quality were checked in NanoDrop (Thermo Fischer Scientific). Next, we used 500 ng of RNA to cDNA conversion using a High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fischer Scientific). The RT-qPCR was performed using specific primers for each gene and Power SYBR Green Master Mix (Thermo Fischer Scientific) in a 7500 Fast Real-Time PCR system (Thermo Fischer Scientific). All procedures were performed following the standard experimental protocol provided by the kit manufacturer.

The designed sequences of primers that were used for gene expression analysis is as follows: SDHA Forward: 5'- CCCGAGGTTTTCACTTCACTG-3', Reverse: 5'- CCTACCACCACTGCATCAAA-3'; GAPDH Forward: 5'- CTGACTTCAACAGCGACACC -3', Reverse: 5'- TGCTGTAGCCAAATTCGTTG -3'; NEAT1 Forward: 5'- GTGGAGGAGTCAGGAGGAAT -3', Reverse: 5'- GCTAAGTTCAGTTCCACAAGACC -3'; DANCR Forward: 5'- GCTCCAGGAGTTCGTCTCTT -3', Reverse: 5'- CAACAGGACATTCCAGCTTC -3'; U73166 Forward: 5'- GCGGTCCTCATCTCTACCAT-3', Reverse: 5'- GTAATTCCAGACCCCTGTGG-3'; TBP Forward: 5'- AGCTGTGATGTGAAGTTTCC-3', Reverse: 5'- TCTGGGTTTGATCATTCTGTAG-3'.

Subcellular fractionation

To obtain RNA from A375 cell line subcellular fractions, we utilized the Ambion PARIS kit (Thermo Fischer Scientific) following instructions provided by the manufacturer. Briefly, melanoma cells were trypsinized, and a total of 1×10^6 cells was pelleted in a microfuge tube. These cells were submitted to cell fractionation and centrifugation at 4°C, resulting in partitioned nuclear and cytoplasmic fractions. The supernatant was relocated to another microfuge tube, and the pellet remained in the same tube. The following steps included each

subcellular lysate being submitted to column binding and washing, and each fraction of nuclear RNA and cytoplasmic RNA was collected in different tubes. The subsequent steps included DNase treatment, RNA quality control, RNA quantification, and cDNA production, as mentioned above.

shRNA constructs and lentiviral transfection

First, we used the lncRNA U73166 FASTA sequence with best ENSEMBL support to design three shRNAs using the web-based tool for siRNA selection from Whitehead Institute (<http://sirna.wi.mit.edu/>). Then, we ordered the oligos Sense and Antisense (Exxtend Oligos), and they were annealed in thermocycler under the following conditions: 95°C for 4 min, 70°C for 10 min, and then slowly cooling down to the end of the day. These double-stranded oligo DNAs were purified with Wizard DNA Purification Kit (Promega). We used 6µg of the lentiviral vector pLKO.1 (Addgene) for digestion with AgeI and EcoRI restriction enzymes (New England Biolabs) according to manufacturer instructions. After this reaction, the digested product was checked in agarose gel for its relative size, and it was confirmed the successful restriction digestion reaction. Subsequently, the gel band was purified and then used for a ligation reaction, which was carried out with 20 ng of digested pLKO.1 and double-stranded oligo DNAs using T4 DNA ligase (New England Biolabs) and proper buffer at 16°C overnight. The resulting ligation products were inserted into DH5α competent cells (Thermo Fischer Scientific) through thermal bacterial transformation. Then, positive colonies were cultivated 37°C overnight in LB broth, and the bacteria were pelleted to plasmid DNA extraction. These plasmids containing shRNAs were submitted to Sanger sequencing in ABI 3500xL Genetic Analyzer equipment (Thermo Fischer Scientific) and the correct insertion of shRNAs into pLKO.1 vector and respective sequences were confirmed. Then, pLKO.1 containing shRNAs (construct) were amplified and purified using Midiprep kit (Qiagen).

For lentiviral production, we used HEK293T cell lines for transfection in a 6-well plate. We used 250ng per well of lentiviral envelope pMD2.G (Addgene) plasmid, 1,25µg of psPAX2 (Addgene) packaging plasmid, 1,25µg of each construct, and PEI MAX (Polysciences, Inc) at a concentration of 1 mg/mL. Later, lentiviral particles were collected from HEK293T culture media and utilized to transduce A375 melanoma cells. Then, transfected cells expressing shRNAs against lncRNA U73166 were selected with 1 µg/mL puromycin for at least three days.

To certify that only cell lines expressing PLKO-shRNAs survived, non-transduced A375 was used as a control and treated with identical Puromycin concentrations during the same period. The cells transfected with the two selected shRNAs were named shU73166#1 and shU73166#3, and its oligonucleotides sequences are the following: shU73166#1 Forward: 5' – CCGGCCTGTCAATTCAGCCTTGTCTCGAGACAAGGCTGAATTGACAGGTTTTTG – 3', shU73166#1 Reverse: 5' – AATTCAAAAACCTGTCAATTCAGCCTTGTCTCGAGACAAGGCTGAATTGACAGG – 3', shU73166#3 Forward: CCGGCATTCATCAACCCTCAGGACTCGAGTCCTGAGGGTTGATGAATGTTTTTG – 3', shU73166#3 Reverse: AATTCAAAAACATTCATCAACCCTCAGGACTCGAGTCCTGAGGGTTGATGAATG – 3'. The empty pLKO.1 vector was transfected and used as a negative control (shPLKO#NC).

Proliferation assay

A375 cells were seeded at a density of 5.000 cells/well in 96-well culture plates and cultured in DMEM medium. The first measurement (time = 0h) was performed after 3h of the experiment started to allow cells to attach to the bottom of the wells. The following measurements were performed according to the continuous experiment time (24h, 48h, 72h, and 96h). After each time point, the DMEM medium was removed from plates, and cells were fixed with 70% ethanol for 10 min at room temperature. Then, ethanol was removed, and crystal violet (0.5%) was added and incubated at room temperature for 15 min. Subsequently, fixed cells were washed six times with water, and plates waited until completely dry. Then, 100 µl of 10% acetic acid was added to each well and incubated for 30 min at room temperature. Finally, absorbance values at 540 nm were measured in the FLUOstar Omega plate reader (BMG Labtech). All the experiments were performed in 5 replicates.

Transwell migration and invasion assays

In vitro cell migration was performed using Thincert Cell Culture Insert For 24 Well Plates (Greiner Bio-One). Briefly, a volume of 600 µL of cell suspension (1×10^4 cells) in DMEM serum-free medium was added into the upper chambers. A volume of 600 µL DMEM medium with 10% FBS without antibiotic was added in the lower chamber to induce cell

migration. After 24h incubation, the medium was removed, and migrated cells were fixed with 4% paraformaldehyde and stained using 0,5% crystal violet solution. The non-invading cells were removed from the inserts' interior using a cotton swab, and five random fields were photographed using the inverted microscope IX71 system (Olympus). Images were later processed, quantified, and analyzed using ImageJ software.

In vitro cell invasion was conducted using BioCoat Matrigel Invasion Chamber assay (Corning). The invasion chamber was removed from the freezer and rehydrated with DMEM medium at 37°C. DMEM was added to the inserts interior and the bottom of wells 2 hours before the experiment. The following steps were performed similarly to those briefly described above in the migration assay. All the experiments were performed in triplicate.

Wound healing assay

A375 melanoma cells were plated in 6-well plates at a density of 5×10^4 cells per well and cultivated for 6 hours until they reached 90% of confluence. After that, the cell monolayer was gently scratched using a sterile 200 μ L pipette tip in a continuous movement. Each well was washed twice with pre-warmed at 37°C 1X PBS, and 5 ml of DMEM medium were added to each well. All the plates remained in controlled conditions of 37°C and 5% CO₂. The images of specific points in each well were taken in 0h, 24h, and 48h. We used Image J software (Bethesda, MD, USA) to process images acquired and quantitative analysis. The quantification of the relative wound area closure is presented in relative units. Results represent the mean of three measurements of each wounded area obtained in three independent experiments.

Statistical and image analysis

The statistical analysis was carried out using the R platform and the PRISM software package (version V.6.01, GraphPad Software, La Jolla, California USA). Values of $P \leq 0.05$ were considered statistically significant. ImageJ software was used to process and perform measurements in wound healing experiments, invasion, and transwell migration assays.

Results

The novel lncRNA U73166 is upregulated in melanoma and is correlated with invasiveness.

Our previous work using a melanoma progression model composed of melanocytes, primary and metastatic melanoma samples demonstrated various deregulated genes, including a few known lncRNAs.⁴⁰ Further analysis was carried out to discover novel lncRNAs impacting melanoma, and candidates were prioritized due to their potential association with invasiveness. In this sense, we found the intergenic lncRNA U73166 (ENSG00000230454) located in the region between protein-coding genes SEMA3B and GNAI2 (**FIGURE 1A**), and this transcript was selected to be further investigated. It was found to be upregulated in metastatic melanoma cell lines compared to normal melanocytes (log fold change: 4.32; Adjusted *P*-value: 0.038). This lncRNA demonstrated a significant positive correlation with invasiveness score in melanocytic cell lines and melanoma samples from TCGA consortium ($r=0.64$, $P=0.0055$ and $r=0.1$, $P=0.031$, respectively) (**FIGURE 2A and 2D**). In the same analysis, it was possible to verify that lncRNA U73166 demonstrated a significant negative correlation with proliferation score in melanocytic cell lines and TCGA tumors ($r=-0.56$, $P\text{-value}=0.02$ and $r=-0.35$, $P\text{-value}=3.1\text{e-}15$, respectively) (**FIGURE 2B and 2E**). According to the ENSEMBL database, the most reliable version of U73166 lncRNA is 2625 nucleotides long, encompassing two exons, and up to now, there is no more information in the scientific literature regarding this transcript.

Figure 1

Genomic context of the lncRNA U73166 and experimental approach utilized. A) UCSC genome browser image depicting localization of lncRNA U73166 and neighboring coding genes. The transcript is zoomed (dashed lines) to demonstrate that lncRNA U73166 is composed of 2 exons. Red lines illustrate the regions that shRNAs target the lncRNA transcript (shU1 = shU73166#1, shU2 = shU73166#2, and shU3 = shU73166#3). Black arrows indicate the designed primers for RT-qPCR experiments (pF = primer forward and pR = primer reverse). B) Silencing efficiency experiment showing that designed shRNAs can effectively reduce expression levels of the lncRNA U73166. TBP was used as an internal control to normalize the amount of RNA in the samples. The student's t-test was performed to compare differences between experimental groups. Data are presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. C) Sanger sequencing from shU73166#1 and shU73166#3 demonstrating correct orientation and insertion of the shRNAs into the plasmid PLKO.1. Blue and yellow highlighted areas represent sense and antisense sequences from each shRNA, respectively. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

The lncRNA U73166 is expressed in a melanoma-testis pattern.

We decided to investigate the expression of the lncRNA U73166 in a public data platform,⁴¹ and noted that its expression is higher in testis than any other normal or tumoral tissues (**SUPPLEMENTARY FIGURE 1A and 1B**). We decided to check these results experimentally, and we tested lncRNA U73166 gene expression in different melanocytic cell lines and normal tissues. We confirmed that the lncRNA U73166 is more expressed in normal testis tissue when compared to other normal human tissues (**FIGURE 2C**). Interestingly, we also confirmed in melanocytic cell lines that it is highly expressed in melanoma cells compared to melanocytes, without any specific trend of enrichment to a particular melanoma progression phase (**FIGURE 2F**). Also, we analyzed the lncRNA U73166 median expression in TCGA public data and did not detect differences between different subgroups of melanoma samples

(SUPPLEMENTARY FIGURE 2A) or between primary and metastatic melanoma samples (SUPPLEMENTARY FIGURE 2B).

Figure 1

Gene Set Variation Analysis of invasive/proliferative profile and lncRNA U73166 gene expression in normal tissues and melanocytic cells. A) Positive correlation between lncRNA U73166 gene expression and invasive score in melanocytic cell lines. B) Negative correlation between lncRNA U73166 gene expression and proliferative score in melanocytic cell lines. C) Gene expression of the lncRNA U73166 in diverse normal tissues showing higher expression in testis. SDHA was used as internal control and the 2- Δ Ct method was utilized for normalization and analysis. D) Positive correlation between lncRNA U73166 gene expression and invasive score in TCGA melanoma samples. E) Negative correlation between lncRNA U73166 gene expression and proliferative score in TCGA melanoma samples. F) Gene expression of the lncRNA U73166 in melanocytes, primary and metastatic melanoma cell lines. TBP was used as internal control and the 2- Δ Ct method was utilized for normalization and analysis.

Downregulation of lncRNA U73166 demonstrates association with proliferation and invasion.

We also decided to experimentally test if our previous analysis demonstrating a positive association of the lncRNA U73166 with invasiveness and a negative association with proliferation would be confirmed. Thus, to evaluate the effect of the lncRNA U73166 downregulation, we silenced it in melanoma cell line A375 using short hairpin RNA (shRNA).

For that, three shRNAs were designed and, two of them (shU31766#1 and shU73166#3) were used to target lncRNA U73166 in downstream assays (**FIGURE 1A**). The shU31766#1 and shU73166#3 were selected according to silencing efficiency – 68% and 51%, respectively (**FIGURE 1B**) – and its successful cloning and Sanger sequencing confirmation (**FIGURE 1C**). Our previous bioinformatics findings demonstrated significant invasiveness associated with the lncRNA U73166 expression, and after knockdown of this gene, we found significantly reduced invasion ability (**FIGURE 3A, 3B, 3D, and 3E**). The opposite phenotype evaluated, *i.e.*, proliferation, expected to increase after silencing, did not respond as previous bioinformatics findings. Instead, after 48 hours from the experiment start, significantly higher proliferation rates were found in controls than in silenced cells (**FIGURE 3C and 3F**), which may imply lncRNA U73166 interfering in this process. Therefore, as our primary interest is related to metastasis, we decided to check if the lncRNA could impact more related processes as migration.

Figure 2

Effect of lncRNA U73166 knockdown on cell invasion and proliferation. A) and D) Control samples demonstrated significant higher number of cells invading than silenced cells. Student's t-test was performed to compare differences between experimental groups. Data is presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. B) and E) Representative images depicting differences found and that control samples invasion was more pronounced than cells that has lncRNA U73166 silenced. C) and F) Proliferation assay showing that after 48h the control samples presented higher rates of proliferation than cells which were silenced. A), B) and C) images are from shU73166#1 silencing, and D), E) and F) images are from shRNAU73166#3 silencing. Statistical analysis was based on ANOVA test. Data is presented as mean $\pm$ SD. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

lncRNA U73166 silencing impacts cell migration

Further analysis was conducted using different assays to evaluate if lncRNA U73166 was associated with migration. Using transwell migration assay, we checked if cells could migrate through the porous membrane, and we found that the number of migrating control cells was significantly higher than silenced cells (**FIGURE 4**). This result indicates that lncRNA U73166 gene expression may also induce the migratory phenotype of melanoma cells. So, we decided to test if lncRNA U73166 reduced expression levels could also influence collective cell migration, and for that, we performed the wound healing ("scratch") assay. Interestingly, we found that control cells presented higher migration rates than silenced cells (**FIGURE 5**). This result indicates that collective melanoma cell migration could also be affected by reduced lncRNA U73166 gene expression. Therefore, we could infer that lncRNA U73166 gene expression can impact melanoma cells in different cell migration assays.

Figure 3

Effect of lncRNA U73166 knockdown on cell migration. A) and C) Quantitation of migration assays showing significantly reduced number of migrating cells after lncRNA U73166 knockdown. B) and D) Representative images illustrating differences between conditions which control samples migration was more prominent than lncRNA U73166 silenced cells. A) and B) images are from shU73166#1 silencing, and C) and D) images are from shU73166#3 silencing. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Figure 4

Wound healing assay. A) and C) Representative images showing more pronounced decrease in wound area over time in control samples when compared to silenced cells. B) and D) Significant higher relative area was covered by control cells than silenced cells. Student's t-test was performed to compare differences between experimental groups. Data is presented as mean $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$, *** $P \leq 0.001$.

Subcellular fraction analysis demonstrates nuclear enrichment of the lncRNA U73166

It is well known that many lncRNAs have bias expressions to specific subcellular compartments.⁴³ Thus, we decided to check if the lncRNA U73166 is enriched in cytoplasmic or nuclear compartments. This analysis was performed using public data derived from ENCODE and available in lncATLAS.⁴⁴ The majority of available cell lines data demonstrated a clear lncRNA U73166 gene expression trend towards nuclear enrichment (**FIGURE 6A**). Curiously, the unique cell line representative from melanoma (SKMEL5) in this dataset did not present any results to lncRNA U73166 (**FIGURE 6A**). Due to this intriguing result, we decided to explore this lack of information experimentally. For that, we separated and examined subcellular compartments from melanoma cell line A375 to check lncRNA U73166 subcellular enrichment expression. We found a high enrichment of the lncRNA U73166 in the nuclear

fraction compared to the cytoplasmic fraction (**FIGURE 6B and 6C**). Surprisingly, our results demonstrated a higher enrichment than the nuclear-enriched marker lncRNA NEAT1 commonly used in this analysis (**FIGURE 6C**). It is essential to mention that we utilized the same lncRNA gene markers for subcellular compartments enrichment as the public database.

Figure 5

Subcellular localization and enrichment of lncRNA U73166. A) Plot obtained from lncATLAS showing the subcellular localization of lncRNA U73166 for diverse cell lines (highlighted area in the center), except to the unique melanoma cell line present in the dataset (SK-MEL-5). Markers for subcellular localization comparison are showed: on the left side, cytoplasmic lncRNA marker DANCER, and on the right side the nuclear retained lncRNA NEAT1. B) Cytoplasmic fraction of A375 cell line showing enrichment of cytoplasmic marker DANCER, and scarce enrichment of nuclear marker NEAT1 and lncRNA U73166. C) Nuclear fraction of A375 cell line showing low enrichment of cytoplasmic marker DANCER and high enrichment levels of nuclear marker NEAT1 and lncRNA U73166. The $2^{-\Delta Ct}$ method was utilized for normalization and analysis.

Melanoma cell lines and public data indicate lncRNA U73166 association with Vemurafenib resistance in BRAFV600E mutants.

To check if the lncRNA U73166 is associated with melanoma resistance, we utilized three melanoma cell lines that harbor the BRAFV600E mutation. These original cell lines (naïve) were treated with increasing Vemurafenib concentrations to acquire drug resistance, and then they were labeled as resistant. Our results demonstrate that resistant cell lines express significantly higher levels of the lncRNA U73166 than naïve cell lines (**FIGURE 7A**). This result indicates that cell lines that undergo Vemurafenib resistance may be associated with lncRNA U73166 transcript levels. Moreover, we used public data from a patient treated with

Vemurafenib and underwent melanoma biopsy before and after acquiring Vemurafenib resistance and compared it with five different patients with different anti-melanoma drugs. The results showed that all five patients conducted with other treatments did not correlate with lncRNA U73166 levels (**FIGURE 7B**). However, a patient treated with Vemurafenib and acquired resistance presented approximately ten times higher lncRNA U73166 gene expression than before (**FIGURE 7C**). These results could implicate a possible correlation between melanoma resistance and higher levels of lncRNA U73166.

Figure 6

Vemurafenib-resistance in melanoma cell lines, patient samples and lncRNA U73166 correlation of gene expression with experimentally verified RBP. A) RT-qPCR from three cell lines pairs (naïve and resistant) showing higher fold change of lncRNA U73166 in resistant cell lines compared with naïve cells. The data are presented as means $\pm$ SD from three independent experiments performed in triplicate. B) Five melanoma patients treated with a combination of Dabrafenib + Trametinib demonstrated unequal levels of lncRNA U73166 gene expression. C) A patient that was treated only with Vemurafenib showed ten times elevated levels of lncRNA U73166 after acquiring drug resistance. D) Positive and significant correlation of gene expression between HNRNPA2B1 and lncRNA U73166. E) Positive and significant correlation of gene expression between SRSF1 and lncRNA U73166. F) Positive and significant correlation of gene expression between RBFOX2 and lncRNA U73166.

lncRNA U73166 interacts with diverse proteins and is a potential mediator of deregulated RNA processing in cancer.

To further explore the lncRNA U73166 findings and obtain insights about its function in the cell, we decide to check if protein partners interact with this transcript. Using CLIP-Seq public data,⁴² we found many RNA-Binding Proteins (RBP) that directly interact with lncRNA U73166 (**SUPPLEMENTARY TABLE 1**). We ranked all these RBP interacting partners, and the top 10 well-supported genes (with at least 4 CLIP-Seq supporting experiments) were shortlisted. From that list, we analyzed the positive correlation with lncRNA U73166 gene expression. Then, we separated three genes with the highest coefficient and significance. Notably, HNRNPA2B1 ($R=0.3$ and $P\text{-value} = 9.2e-11$), SRSF1 ($R= 0.28$ and $P\text{-value} = 9.3e-10$), and RBFOX2 ($R=0.27$ and $P\text{-value} = 3.3e-09$) demonstrated higher correlation and significance with lncRNA U73166 gene expression (FIGURE 7D, 7E and 7F, respectively).

DISCUSSION

Recently, many potential regulatory lncRNAs have been identified, and this field shows many transcripts with a wide range of functions. In cancer-related studies, lncRNAs have several roles associated with many aspects of carcinogenesis.²⁹ Due to the specific expression pattern that lncRNAs demonstrate, their importance is being mentioned in an increasing number of studies in the last decades. Indeed, some of them have already been described as specific biomarkers,⁴⁵ and other cancer-specific lncRNAs probably will be revealed in the following years. The studies in this area will enable researchers to tackle many challenges in cancer research that are difficult to address with current knowledge and approaches.

Our findings reveal the lncRNA U73166 gene expression levels for the first time that seems to be expressed in a melanoma-testis pattern, which resembles the antigen-testis pattern, particularly interesting in the search for molecules as potential biomarkers and targetable molecules in the tumor.^{46, 47} Thus, the novel lncRNA U73166 can be a valuable transcript to be explored in melanoma assessment and treatment in the future.

Using knockdown experiments, we could test if our previous bioinformatics findings would be experimentally validated. Our results demonstrated that cells were significantly impacted in their invasive potential after silencing the lncRNA U73166 showing reduced levels of invasion. Similarly, using an insert-based migration experiment, we found a higher level of

cells migrating in control samples than cells in which lncRNA U73166 was silenced. We also found that in wound healing assay, silenced cells have decreased ability to cover the scratch area, demonstrating that lncRNA U73166 also affects collective cell migration.

Once the expression of lncRNA U73166 is positively associated with invasiveness (bioinformatics supported), migration, and invasion (experimentally supported), our findings suggest a role of lncRNA U73166 in melanoma invasive and migratory phenotype. Surprisingly, the proliferation rate – that was negatively correlated to lncRNA U73166 gene expressions in bioinformatics analysis – was found elevated in control samples compared with silenced cells in our experiments. The disparities between the results of proliferation experiments versus bioinformatics analysis may reflect idiosyncrasies from the different cell lines and TCGA samples used. We believe that the A375 melanoma cell line used in this study does not comprise all the different aspects that other melanoma cell lines may harbor, such as specific mutations (other than BRAFV600E) or different sites that they metastasize (for metastatic cell lines). Furthermore, it is possible to observe that proliferation shows significant differences 48h after the experiment started, and the wound healing experiment was conducted only for 48h. That difference could mean that, when synchronized, silenced cells may show a robust invasive phenotype in the first hours and then switch to a more proliferative profile. That is an important point due to the fine-tuning way that RNAs can regulate cells and demonstrate their different roles in a timescale manner.

It is vastly known that the BRAFV600E mutation is present in approximately 50% of melanoma cases. This alteration constitutively activates the MAPK/ERK pathway and is involved in increased proliferation. Although drugs target this alteration (Vemurafenib), treatment shortly fails because cells acquire resistance, mainly shifting to CRAF and ARAF activation. Thus, understanding how resistance acts are essential, and recent studies on lncRNA could shed light on this process. Therefore, using different melanoma cell lines that harbor BRAFV600E mutation, we could show that lncRNA U73166 could play a key role in drug resistance as it shows higher levels in Vemurafenib-resistant cell lines when compared to paired naïve cells. Similarly, samples originated from patient biopsies before and after resistance demonstrated higher levels of lncRNA expression in melanoma when the patient acquired Vemurafenib resistance. These results could provide essential information that lncRNA U73166 can impact and be a potential biomarker of resistance, and its levels could be essential in stabilizing acquired drug resistance.

Subcellular fractions analysis is an important indicator of action sites that lncRNAs can play their roles in cells. Our findings revealed higher enrichment of lncRNA U73166 in nuclear fraction than in cytoplasmic fraction. This enrichment would indicate that it could act at the transcriptional level or other nuclear relevant events. Analysis in the public database of interactions supported by CLIP-seq data allowed us to retrieve proteins that directly interact with lncRNA U73166 and found many of them acting in RNA processing and splicing events. Some of these proteins have recently been revealed as having key roles in migration, invasion, epithelial-mesenchymal transition (EMT), metastasis, and associated with other lncRNAs in other types of cancer.⁴⁸⁻⁵² It is well known that in the nuclear compartment, lncRNAs may act as a scaffold and be associated with proteins in the gene regulation process. Therefore, potential protein partners interacting with lncRNA U73166 were investigated and HNRNPA2B1, SRSF1 and RBFOX2 demonstrated a robust positive correlation expression with lncRNA U73166. While insufficient information regarding melanoma was found in the literature, we found that RBFOX2 and HNRNPA2B1 have been established to regulate tumor development – primarily through EMT-related processes – and in pancreatic cancer, HNRNPA2B1 acts through the ERK/Snail pathway.^{50, 53, 54} It is essential to mention that ERK1/2 are critical regulators of the MAPK signaling pathway and are under downstream activation of A/B/C-RAF genes.⁵⁵ Therefore, direct interaction between lncRNA U73166 and these RBPs and positive correlation may indicate a regulatory association in gene expression of these molecules; however, it requires further investigation. Thus, the relationship between lncRNA U73166 and BRAFV600E mutants can be an important association, and this transcript may be an essential mediator in these signaling cancer pathways. Additionally, to our results, further analysis in the future should include the silencing of lncRNA U73166 using ASO (antisense oligos) to assess if the phenotypic changes remain or are more pronounced.

Therefore, our findings showing that silencing lncRNA impacts melanoma tumoral processes and that Vemurafenib-resistant samples have significantly higher levels of lncRNA U73166 could be helpful to patient assessment and management. In the future, these results may be beneficial to melanoma research, to explore the field of the lncRNAs biomarkers and to achieve better approaches, and improvements in melanoma resistance therapy.

Author Contribution Statement:

Ádamo Davi Diógenes Siena: conceptualization and design (lead); methodology (lead); validation (lead); writing-review and editing manuscript (lead); **Isabela Ichihara de Barros:** methodology (equal), review and editing (equal); **Camila Baldin Storti:** methodology (equal), review (equal); **Carlos Alberto Oliveira de Biagi Júnior:** methodology (equal), review (equal); **Larissa Anastacio da Costa Carvalho:** conceptualization (equal), methodology (equal), review and editing (equal); resources (equal); **Silvyia Stuchi Maria-Engler:** conceptualization (equal), review and editing (equal); resources (equal); **Josane Freitas de Sousa:** review and editing (equal); Supervision (equal); **Wilson Araújo Silva Jr:** conceptualization (equal), review and editing (equal); Supervision (lead); resources (lead);

Acknowledgments

This work was supported by The National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), grants #141880/2016-3, #309187/2015-0, # 408769/2018-1; and São Paulo Research Foundation (FAPESP), grants #2013/08135-2, #2018/04017-9, #2017/04926-6 and #2018/14936-1. We would like to thank Prof Dr Andrea Rentmeister from WWU-Germany that would collaborate with this work, but due to the pandemic the experiments had to be interrupted.

Conflict of Interest Statement

All the authors declare no competing interests.

Data Availability Statement

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author upon reasonable request.

References

- 1 Shain AH, Bastian BC. From melanocytes to melanomas. *Nat. Rev. Cancer* 2016; **16**: 345–58.
- 2 Clark WH, Elder DE, Guerry D, et al. A study of tumor progression: the precursor lesions of

- superficial spreading and nodular melanoma. *Hum. Pathol.* 1984; **15**; 1147–65.
- 3 Berk-Krauss J, Stein JA, Weber J, et al. New systematic therapies and trends in cutaneous melanoma deaths among US whites, 1986–2016. *Am. J. Public Health* 2020; **110**; 731–3.
 - 4 Whiteman DC, Green AC, Olsen CM. The Growing Burden of Invasive Melanoma: Projections of Incidence Rates and Numbers of New Cases in Six Susceptible Populations through 2031. *J. Invest. Dermatol.* 2016; **136**; 1161–71.
 - 5 Mason R, Au L, Ingles Garces A, et al. Current and emerging systemic therapies for cutaneous metastatic melanoma. *Expert Opin. Pharmacother.* 2019; **20**; 1135–52.
 - 6 Siegel RL, Miller KD, Fuchs HE, et al. Cancer Statistics, 2021. *CA. Cancer J. Clin.* 2021; **71**; 7–33.
 - 7 Akbani R, Akdemir KC, Aksoy BA, et al. Genomic Classification of Cutaneous Melanoma. *Cell* 2015; **161**; 1681–96.
 - 8 Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. The RAF proteins take centre stage. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; **5**; 875–85.
 - 9 Wan PTC, Garnett MJ, Roe SM, et al. Mechanism of activation of the RAF-ERK signaling pathway by oncogenic mutations of B-RAF. *Cell* 2004; **116**; 855–67.
 - 10 Bhatia P, Friedlander P, Zakaria EA, et al. Impact of BRAF mutation status in the prognosis of cutaneous melanoma: An area of ongoing research. *Ann. Transl. Med.* 2015; **3**; 24.
 - 11 Ascierto PA, Kirkwood JM, Grob J-J, et al. The role of BRAF V600 mutation in melanoma. *J. Transl. Med.* 2012; **10**; 85.
 - 12 Spathis A, Katoulis A, Damaskou V, et al. BRAF mutation status in primary, recurrent, and metastatic malignant melanoma and its relation to histopathological parameters. *Dermatol. Pract. Concept.* 2019; **9**; 54.
 - 13 Si L, Kong Y, Xu X, et al. Prevalence of BRAF V600E mutation in Chinese melanoma patients: Large scale analysis of BRAF and NRAS mutations in a 432-case cohort. *Eur. J. Cancer* 2012; **48**; 94–100.
 - 14 Sumimoto H, Imabayashi F, Iwata T, et al. The BRAF-MAPK signaling pathway is essential for cancer-immune evasion in human melanoma cells. *J. Exp. Med.* 2006; **203**; 1651–6.
 - 15 Cantwell-Dorris ER, O’Leary JJ, Sheils OM. BRAFV600E: Implications for carcinogenesis and molecular therapy. *Mol. Cancer Ther.* 2011; **10**; 385–94.
 - 16 Fedorenko I V., Paraiso KHT, Smalley KSM. Acquired and intrinsic BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E mutant melanoma. *Biochem. Pharmacol.* 2011; **82**; 201–9.
 - 17 Manzano JL, Layos L, Bugés C, et al. Resistant mechanisms to BRAF inhibitors in melanoma. *Ann. Transl. Med.* 2016; **4**; 1–9.
 - 18 Olbryt M, Pięłowski W, Rajczykowski M, et al. Genetic Profiling of Advanced Melanoma: Candidate Mutations for Predicting Sensitivity and Resistance to Targeted Therapy. *Target. Oncol.* 2020; **15**; 101–13.
 - 19 Tanda ET, Vanni I, Boutros A, et al. Current State of Target Treatment in BRAF Mutated Melanoma. *Front. Mol. Biosci.* 2020; **7**; 154.
 - 20 Giunta EF, De Falco V, Napolitano S, et al. Optimal treatment strategy for metastatic melanoma patients harboring BRAF-V600 mutations. *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2020; **12**.

- 21 Nakai N, Kishida T, Shin-Ya M, et al. Therapeutic RNA interference of malignant melanoma by electrotransfer of small interfering RNA targeting Mitf. *Gene Ther.* 2007; **14**; 357–65.
- 22 Ryu B, Hwang S, Alani RM. MicroRNAs as an emerging target for melanoma therapy. *J. Invest. Dermatol.* 2013; **133**; 1137–9.
- 23 Viola JR, Rafael DF, Wagner E, et al. Gene Therapy for Advanced Melanoma: Selective Targeting and Therapeutic Nucleic Acids. *J. Drug Deliv.* 2013; **2013**; 1–15.
- 24 Van Dülmen M, Rentmeister A. mRNA Therapies: New Hope in the Fight against Melanoma. *Biochemistry* 2020; **59**; 1650–5.
- 25 Wang J, Chen J, Sen S. MicroRNA as Biomarkers and Diagnostics. *J. Cell. Physiol.* 2016; **231**; 25–30.
- 26 Bolha L, Ravnik-Glavač M, Glavač D. Long Noncoding RNAs as Biomarkers in Cancer. *Dis. Markers* 2017; **2017**.
- 27 Derrien T, Johnson R, Bussotti G, et al. The GENCODE v7 catalog of human long noncoding RNAs: analysis of their gene structure, evolution, and expression. *Genome Res.* 2012; **22**; 1775–89.
- 28 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**; 38–44.
- 29 Schmitt AM, Chang HY. Long Noncoding RNAs in Cancer Pathways. *Cancer Cell* 2016; **29**; 452–63.
- 30 Jiang M-C, Ni J-J, Cui W-Y, et al. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am. J. Cancer Res.* 2019; **9**; 1354–66.
- 31 Sarfi M, Abbastabar M, Khalili E. Long noncoding RNAs biomarker-based cancer assessment. *J. Cell. Physiol.* 2019; **234**; 16971–86.
- 32 Hulstaert E, Brochez L, Volders PJ, et al. Long non-coding RNAs in cutaneous melanoma: Clinical perspectives. *Oncotarget* 2017; **8**; 43470–80.
- 33 Wei Y, Sun Q, Zhao L, et al. lncRNA UCA1-miR-507-FOXO1 axis is involved in cell proliferation, invasion and G0/G1 cell cycle arrest in melanoma. *Med. Oncol.* 2016; **33**; 88.
- 34 Khaitan D, Dinger ME, Mazar J, et al. The melanoma-upregulated long noncoding RNA SPRY4-IT1 modulates apoptosis and invasion. *Cancer Res.* 2011; **71**; 3852–62.
- 35 Zhou X, Liu S, Cai G, et al. Long non coding RNA MALAT1 promotes tumor growth and metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *Sci. Rep.* 2015; **5**.
- 36 Flockhart RJ, Webster DE, Qu K, et al. BRAFV600E remodels the melanocyte transcriptome and induces BANC1 to regulate melanoma cell migration. *Genome Res.* 2012; **22**; 1006–14.
- 37 Leucci E, Vendramin R, Spinazzi M, et al. Melanoma addiction to the long non-coding RNA SAMSON. *Nature* 2016; **531**; 518–22.
- 38 Sandri S, Faião-Flores F, Tiago M, et al. Vemurafenib resistance increases melanoma invasiveness and modulates the tumor microenvironment by MMP-2 upregulation. *Pharmacol. Res.* 2016; **111**; 523–33.
- 39 Faião-Flores F, Alves-Fernandes DK, Pennacchi PC, et al. Targeting the hedgehog transcription factors GLI1 and GLI2 restores sensitivity to vemurafenib-resistant human melanoma cells.

- Oncogene* 2017; **36**; 1849–61.
- 40 Siena ÁDD, Plaça JR, Araújo LF, et al. Whole transcriptome analysis reveals correlation of long noncoding RNA ZEB1-AS1 with invasive profile in melanoma. *Sci. Rep.* 2019; **9**; 1–11.
 - 41 Tang Z, Kang B, Li C, et al. GEPIA2: an enhanced web server for large-scale expression profiling and interactive analysis. *Nucleic Acids Res.* 2019; **47**; W556–60.
 - 42 Li J-H, Liu S, Zhou H, et al. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res.* 2014; **42**; D92-7.
 - 43 Carlevaro-Fita J, Johnson R. Global Positioning System: Understanding Long Noncoding RNAs through Subcellular Localization. *Mol. Cell* 2019; **73**; 869–83.
 - 44 Mas-Ponte D, Carlevaro-Fita J, Palumbo E, et al. LncATLAS database for subcellular localization of long noncoding RNAs. *RNA* 2017; **23**; 1080–7.
 - 45 Loeb S, Partin AW. PCA3 Urinary Biomarker for Prostate Cancer. *Rev. Urol.* 2010; **12**; e205-6.
 - 46 Scanlan. MJ, Gure. AO, Jungbluth. AA, et al. Cancer/testis antigens: an expanding family of targets for cancer immunotherapy. *Immunol. Rev.* 2002; **188**; 22–32.
 - 47 Gibbs ZA, Whitehurst AW. Emerging Contributions of Cancer/Testis Antigens to Neoplastic Behaviors. *Trends in Cancer* 2018; **4**; 701–12.
 - 48 Shen Y, Feng Y, Li F, et al. LncRNA ST3GAL6-AS1 promotes invasion by inhibiting hnRNPA2B1-mediated ST3GAL6 expression in multiple myeloma. *Int. J. Oncol.* 2021; **58**; 1–1.
 - 49 Gupta A, Yadav S, Pt A, et al. The HNRNPA2B1–MST1R–Akt axis contributes to epithelial-to-mesenchymal transition in head and neck cancer. *Lab. Investig.* 2020; **100**; 1589–601.
 - 50 Dai S, Zhang J, Huang S, et al. HNRNPA2B1 regulates the epithelial-mesenchymal transition in pancreatic cancer cells through the ERK/snail signalling pathway. *Cancer Cell Int.* 2017; **17**; 12.
 - 51 Yu PF, Kang AR, Jing LJ, et al. Long non-coding RNA CACNA1G-AS1 promotes cell migration, invasion and epithelial-mesenchymal transition by HNRNPA2B1 in non-small cell lung cancer. *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018; **22**; 993–1002.
 - 52 Liu Y, Li H, Liu F, et al. Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A2/B1 is a negative regulator of human breast cancer metastasis by maintaining the balance of multiple genes and pathways. *EBioMedicine* 2020; **51**; 102583.
 - 53 Choi S, Sa M, Cho N, et al. Rbfox2 dissociation from stress granules suppresses cancer progression. *Exp. Mol. Med.* 2019; **51**; 1–12.
 - 54 Braeutigam C, Rago L, Rolke A, et al. The RNA-binding protein Rbfox2: An essential regulator of EMT-driven alternative splicing and a mediator of cellular invasion. *Oncogene* 2014; **33**; 1082–92.
 - 55 Guo Y, Pan W, Liu S, et al. ERK/MAPK signalling pathway and tumorigenesis (Review). *Exp. Ther. Med.* 2020; **19**; 1997–2007.

Appendices

Supplementary Table 1. RNA binding proteins experimentally verified interacting with the lncRNA U73166.†

RBP	clusterNum	clipExpNum	clipIDnum	HepG2	K562	pancancerNum	R	pvalue
U2AF2	10	10	20	NA	NA	19	0.029	0.54
SRSF1	8	7	11	NA	NA	21	0.28	9.3e-10
TAF15	7	7	12	NA	NA	22	0.094	0.044
HNRNPA1	8	6	13	NA	NA	14	0.15	0.0015
HNRNPA2B1	12	6	22	NA	NA	22	0.3	9.2e-11
CSTF2T	11	4	22	NA	NA	17	0.13	0.0072
DDX54	4	4	5	NA	NA	16	-0.042	0.37
DGCR8	5	4	5	NA	NA	26	0.2	1.1e-05
HNRNPU	9	4	15	NA	NA	19	0.18	8.2e-05
RBFOX2	5	4	8	NA	NA	16	0.27	3.3e-09
HNRNPK	2	3	3	NA	NA	16	0.16	0.00039
HNRNPUL1	6	3	6	NA	NA	12	0.027	0.56
PRPF8	3	3	4	NA	NA	12	0.039	0.41
SLTM	4	3	5	NA	NA	26	0.33	3.2e-13
ADAR	3	2	4	NA	NA	17	0.061	0.19
AIFM1	3	2	3	NA	NA	12	-0.079	0.09
BUD13	6	2	6	NA	NA	19	0.083	0.074
EIF4A3	8	2	9	2.027	NA	15	-0.045	0.34
ELAVL1	2	2	4	NA	NA	14	0.13	0.0071
FAM120A	7	2	8	NA	NA	13	0.11	0.019
FBL	4	2	4	NA	NA	16	-0.094	0.043
GTF2F1	2	2	3	NA	NA	11	0.11	0.016
LIN28	3	2	3	NA	NA	20	-0.045	0.34
LSM11	2	2	2	NA	NA	21	0.065	0.16
NONO	3	2	3	NA	NA	16	0.12	0.011
NUMA1	8	2	10	NA	NA	25	0.0019	0.97
PCBP2	2	2	4	NA	NA	13	0.17	3e-04
RANGAP1	3	2	4	NA	NA	19	-0.049	0.3
SAFB2	4	2	5	NA	NA	26	0.12	0.0081
TIA1	1	2	2	NA	NA	26	0.24	2.4e-07
U2AF1	2	2	2	NA	NA	23	0.22	1.2e-06
ZNF184	6	2	7	NA	NA	21	0.27	3.3e-09
AUH	3	1	3	NA	NA	13	0.012	0.79
DKC1	3	1	3	NA	NA	12	0.12	0.008
FMR1	2	1	2	NA	NA	19	0.13	0.0048
FUS	1	1	1	NA	NA	25	0.13	0.0042
IGF2BP2	1	1	1	NA	NA	20	0.27	2.5e-09
ILF3	1	1	1	NA	NA	26	0.22	2.7e-06
NOP56	3	1	3	NA	NA	15	0.14	0.0036
NOP58	3	1	3	NA	NA	21	0.27	2.4e-09
RBM10	1	1	1	NA	NA	22	0.1	0.028

SMNDC1	1	1	1	NA	NA	14	0.13	0.0049
SRSF10	1	1	1	NA	NA	25	0.25	4.3e-08
SRSF9	1	1	1	NA	NA	16	0.23	3.4e-07
VIM	1	1	1	NA	NA	14	0.0093	0.84
XRN2	2	1	2	NA	NA	12	0.26	1.7e-08

†The gray highlight show shortlisted RBPs

Supplementary figure 2

A)

B)

The lncRNA U73166 gene expression in melanoma subgroups.