

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

BARBARA YASMIN GARCIA ANDRADE

Caracterização genômica e funcional do lncRNA
RMEL3 em melanoma.

Ribeirão Preto

2023

BARBARA YASMIN GARCIA ANDRADE

**Caracterização genômica e funcional do lncRNA RMEL3 em
melanoma.**

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: Biologia Celular e
Molecular.

Orientadora: Profa. Dra. Enilza Maria
Espreafico

Ribeirão Preto

2023

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.

FICHA CATALOGRÁFICA

Andrade, Barbara Yasmin Garcia

Caracterização genômica e funcional do lncRNA RMEL3 em melanoma. Ribeirão Preto, 2023

135p.;30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP.
Área de concentração: Biologia Celular e Molecular.

Orientadora: Espreafico, Enilza Maria.

1. Melanoma. 2.lncRNA. 3. Via de MAPK. 4. ENSG0000020961.

Título: Caracterização genômica e funcional do lncRNA RMEL3 em melanoma.

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: Biologia Celular e Molecular.

Aprovada em: __/__/____

Banca Examinadora

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr(a): _____ Instituição: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

O primeiro e mais importante agradecimento é aos meus pais. Minha mãe Sônia Garcia por todo o amor e dedicação, e por me apoiar incondicionalmente e me amparar em todos os momentos dessa trajetória, e ao meu pai Acilon Andrade que além do apoio e amor, também me manteve em Ribeirão Preto e tornou possível a conclusão do meu trabalho. Eu não tenho palavras para explicar a gratidão e amor que tenho por vocês.

Aos meus irmãos Sérgio Bruno, Lorena Melo, Amanda Andrade e Acilon Filho e ao meu afilhado-sobrinho João Guilherme que me perdoaram pela distância e as ausências e torceram por mim em todos os momentos. Às minhas amigas-irmãs Mariana Mendes, Lorena Gabrielle, Jéssica Teixeira e Alanna Tonhá por torcerem mais que tudo por cada passo que dei em minha caminhada acadêmica. Ao meu melhor amigo Luís Henrique por toda palhaçada que fez dos meus desabafos. Aos outros membros da minha família, tias, tios e primos, por todo carinho e incentivo.

Aos amigos que Ribeirão Preto me apresentou: Edismauro, Elaine, Daniel Dobby, Maurício, Corina, Raul, Mariana, Alex, Vanessa, Daniel, Gabriel, entre outros. Meu muito obrigada por todos os momentos de desabado, conselhos, risada e carinho que vocês me proporcionaram todos esses anos.

Aos amigos e companheiros de laboratório e pós-graduação Jackeline, Airton, Santiago, Rui, muito obrigada por me aturarem e por me ajudarem a crescer como pessoa e como profissional. Um agradecimento especial para Jackeline, que se tornou uma amiga muito querida que sempre me cuidou e me amparou.

Aos meus “filhotes científicos” Vitor, Luana, Márcia e Gustavo por me darem a oportunidade de aprender a mais bela arte – a arte de ensinar. Obrigada pelo convívio diário, palhaçadas e paciência. Espero que levem para vida tudo que de coração eu tentei passar para vocês, seja no âmbito científico como no pessoal.

Aos técnicos do laboratório Joana e Ricardo que organizam e auxiliam no melhor andamento do laboratório, meu muito obrigada. Um agradecimento imenso a Joana, que mais que companheira de trabalho, me adotou como filha e sempre me aconselhou e amparou como uma mãe.

AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS

À minha orientadora Professora Dra Enilza Maria Espreafico que me acolheu em seu laboratório e possibilitou a realização desse trabalho. Obrigada por me ajudar a desenvolver meu pensamento científico, me trazendo um grande crescimento profissional.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP) por todas as aulas, discussões científicas e disponibilidade de contribuir com a pesquisa que me ajudaram a realizar meu trabalho e aprender a cada passo dado.

Às secretárias do Programa de Biologia Celular Molecular do Departamento de Biologia Celular e Molecular e Bioagentes Patogênicos da FMRP, Gabriela, Camila e Lúcia, que sempre foram muito prestativas e me auxiliaram em todas as questões burocráticas que me fazia correr para elas pedindo ajuda.

Aos Laboratórios Multiusuário da FMRP pelo apoio técnico, em especial a Tânia pelas ajudas no qRT-PCR e para Bete por todo auxílio prestado e pelas conversas edificantes.

À agência de fomento Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) pela bolsa de Cota Institucional de Demanda Social e pelas bolsas anteriores que possibilitaram toda minha trajetória acadêmica. O presente trabalho foi realizado com apoio da CAPES – Código de Financiamento 001.

Aos demais órgãos de fomento como a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Centro de Terapia Celular (CTC), Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência (FAEPA) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

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

RESUMO

Os RNAs não-codificantes (lncRNAs) constituem uma classe de RNAs diversificados que nos últimos anos tem atraído grande interesse devido ao seu papel em diversos processos celulares fisiológicos e patológicos, como câncer, doenças inflamatórias e degenerativas. O lncRNA RMEL3 é enriquecido em melanoma, particularmente naqueles portadores da mutação BRAF^{V600E} e com fenótipo marcadamente invasivo. No presente trabalho, detectamos pelo menos nove variantes transcritas do locus do gene RMEL3 (ENSG00000250961) expressas na linhagem celular de melanoma BRAF^{V600E} A375, através da amplificação dos transcritos por RT-PCR, e ensaios 3'RACE e 5'RACE. Através de ensaios de hibridização *in situ* (RNA-FISH), demonstramos que transcritos RMEL3 são detectados no núcleo e citoplasma, apresentando uma ampla distribuição citoplasmática em células A375, SKMEL28 e WM902B. O silenciamento mediado por shRNA de RMEL3 reduziu as taxas de formação de colônia e proliferação e reduziu os níveis de fosforilação das proteínas efetoras ERK1/2 e AKT das vias MAPK e PI3K, respectivamente. O silenciamento de RMEL3 também levou ao aumento da apoptose nas células A375, o que foi consistente com a expressão reduzida da proteína antiapoptótica BCL2. Além disso, reduziu a capacidade migratória e invasiva das células A375, bem como a expressão de proteínas importantes que conferem o caráter invasivo das células. Com o objetivo de elucidar os mecanismos moleculares da função de RMEL3, validamos as proteínas ARAF, MST2/STK3 e FAM83D como ligantes de RMEL3 por *pull-down* seguido por western blot e imunoprecipitação de RNA complexado a essas proteínas. Para entender a influência de RMEL3 no programa global de expressão gênica em resposta ao soro em células A375, usamos sequenciamento de próxima geração em larga escala (RNAseq). No total, as células silenciadas apresentaram expressão alterada de 2370 genes (FDR p-valor < 0,05, log₂ fold change < -1 ou > 1), dos quais 804 genes apresentaram log₂ fold change < -2 ou > 2, sendo 278 genes com expressão aumentada (log₂ fold change > 2) e 526 com expressão reduzida (log₂ fold change < - 2). A análise do enriquecimento de vias de genes regulados implica RMEL3 em vias de sinalização, como PI3K-AKT, HIPPO supressor tumoral, AMPK, ácido lisofosfatídico, adesão focal, apoptose e, curiosamente, várias vias imunogênicas e inflamatórias. Com os resultados deste trabalho, buscamos contribuir para uma anotação precisa do gene RMEL3 e elucidar dos mecanismos pelos quais as isoformas melanocíticas exercem suas atividades funcionais.

Descritores: Melanoma, lncRNA, RMEL3, ENSG00000250961, MAPK, PI3K, via de HIPPO, apoptose, migração e invasão, resposta sérica, imunogenicidade, inflamação.

ABSTRACT

Non-coding RNAs (lncRNAs) constitute a class of diversified RNAs that in recent years has attracted great interest due to their roles in various physiological and pathological cellular processes, such as cancer, inflammatory and degenerative diseases. lncRNA RMEL3 is enriched in melanoma, particularly in those carrying the BRAFV600E mutation and with a markedly invasive phenotype. In the present work, we detected at least nine transcript variants from the RMEL3 gene locus (ENSG00000250961) expressed in the BRAFV600E A375 melanoma cell line, through amplification of the transcripts by RT-PCR, and 3'RACE and 5'RACE assays. Through in situ hybridization assays (RNA-FISH), we demonstrated that RMEL3 transcripts are detected in the nucleus and cytoplasm, presenting a wide cytoplasmic distribution in A375, SKMEL28, and WM902B cells. shRNA-mediated silencing of RMEL3 reduced colony formation and proliferation rates, and lowered phosphorylation levels of the effector proteins ERK1/2 and AKT of the MAPK and PI3K pathways, respectively. RMEL3 silencing also led to increased apoptosis in A375 cells, which was consistent with reduced expression of the anti-apoptotic protein BCL2. In addition, it reduced the migratory and invasive capacity of A375 cells, as well as the expression of important proteins that confer the invasive character of cells. Aiming at elucidating the molecular mechanisms of RMEL3 function, we validated the proteins ARAF, MST2/STK3, and FAM83D as ligands of RMEL3 by pulldown followed by immunoprecipitation of RNA complexed to these proteins. To understand the influence of RMEL3 on the global gene expression program in response to serum in A375 cells, we used next-generation high-throughput sequencing (RNAseq). In total, silenced cells showed altered expression of 2370 genes (FDR p-value < 0.05, log₂ fold change < -1 or > 1), from which 804 genes showed log₂ fold change < -2 or > 2, being 278 upregulated (log₂ fold change > 2) and 526 downregulated (log₂ fold change < -2). Analysis of pathway enrichment of regulated genes implicates RMEL3 in signaling pathways, such as PI3K-AKT, HIPPO tumor suppressor, AMPK, Lysophosphatidic acid, focal adhesion, apoptosis, and, interestingly, various immunogenic and inflammatory pathways. With the results of this work, we seek to contribute to an accurate annotation of the RMEL3 gene and elucidation of the mechanisms by which melanocytic isoforms exert their functional activities.

Keywords: Melanoma, lncRNA, RMEL3, ENSG00000250961, MAPK, PI3K, HIPPO, apoptosis, migration and invasion, serum response, immunogenicity, inflammation.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Representação esquemática da localização anatômica dos subtipos de melanoma e a relevância dada exposição à radiação ultravioleta e carga de mutação tumoral, bem como as mutações mais frequentes e características genômicas de cada subtipo. Siglas: CSD, dano solar cumulativo; TMB, carga mutacional do tumor; UVR, radiação ultravioleta; WGD, duplicação de todo o genoma. Adaptado de Oba e Woodman, 2017.....	2
Figura 2 - Distribuição espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (melanoma maligno da pele). Adaptado de De et al., 2023..	3
Figura 3 - Vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. A via canônica da MAPK/ERK inicia com um estímulo extracelular na forma de fatores de crescimento (FCs) que se ligam e ativam o receptor tirosina quinase (RTKs) na membrana celular. Ativação <i>downstream</i> de RAS, RAF e MEK, nessa ordem, convergem na ativação do ativador do fator de transcrição ERK1/2. A cascata P13K/AKT/mTOR também pode ser ativada via RTKs e RAS, e suas principais implicações estão relacionadas à sinalização metabólica e à síntese de proteínas que sustentam o crescimento celular. Adaptado de Braicu et al., 2019.	6
Figura 4 - Organização éxon-íntron dos transcritos anotados no locus RMEL3 mapeado no cromossomo 5, q11.2. Ilustração do locus do gene RMEL3 e a organização éxon-íntron dos transcritos anotados, RMEL3_201 e RMEL3_202 [éxons (retângulos) e íntrons (linhas)]. Em vermelho estão destacados os éxon que são comuns a todas os transcritos. A cabeça de seta nas linhas do íntron 1 indica a direção de transcrição. Os transcritos oriundos do locus de RMEL3 anotados nos bancos de dados ENSEMBL, NONCODE, LNCipedia, NCBI e circBASE.....	18
Figura 5 - Representação esquemática da síntese de cDNA para os ensaios de 3'RACE e 5'RACE. Os retângulos azul-claros representam o iniciador oligo-dT-adaptador e os retângulos laranjas representam os oligos Template-switching (TSO). Fonte: Template switching oligos (TS oligos, TSOs) for cDNA library construction IDT.....	22
Figura 6 - Demonstração esquemática do protocolo de RT de 2 etapas. (Adamopoulos et al., 2022).....	25
Figura 7 - Locais de anelamento dos primer utilizados nas RT-PCR e PCR 3'RACE e 5'RACE.	36
Figura 8 - Amplificação dos transcritos RMEL3_201 e RMEL3_202 com primers gene específico. Foram utilizados 5µL de cada cDNA de A375 sintetizado de maneira diferente na PCR com os primers específicos de RMEL3_201 e RMEL3_202. Nas duas primeiras raiais, foi utilizado cDNA sintetizado com a mistura dos iniciadores oligo-dT e random primers (RP); nas duas raiais seguintes foi utilizado o cDNA sinterizado com olig-dT; e as duas últimas raiais o cDNA foi sinterizado com RP.....	37
Figura 9 - Confirmação da inserção dos fragmentos de RMEL3_201 obtidos por PCR no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. Os clones obtidos após a clonagem dos produtos da PCR RMEL3_201 foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI, que possui dois sítios de clivagem no vetor pGEM-T-Easy que flanqueiam a região de clonagem. Caso a inserção for eficaz, após a digestão com EcoRI o fragmento é destacado.	38
Figura 10 - Esquema dos clones oriundo da amplificação de RMEL3_201. As sequências dos clones das ligações pGEM_RMEL3.1, pGEM_RMEL3.2 e pGEM_RMEL3.3 obtidas após o sequenciamento Sanger foram alinhadas com o genoma humano e todos os clones alinharam no locus genômico de RMEL3. Os	

retângulos representam os éxon e as linhas representam os íntrons. Embaixo de cada éxon está o tamanho em pares de base (pb), e o * indica que o final do éxon não foi sequenciado com eficiência.39

Figura 11 - Eletroforese em agarose dos produtos das 5'RACE PCR e da digestão dos clones obtidos. (A) Gel 1% agarose com os produtos da 5'RACE PCR#1 feitas com o cDNA da HEK293T e A375. As setas vermelhas indicam as regiões que foram cortadas para extração do DNA que será utilizado na próxima etapa. (B) Gel 1% agarose dos produtos da 5'RACE PCR utilizando os DNAs extraídos das seis regiões demarcadas em A. As setas vermelhas indicam as bandas excisadas e posteriormente purificadas. O DNA dessas bandas foi clonado no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. (C) Gel de agarose 1% com as digestões com EcoRI dos clones obtidos com os fragmentos 1 e 2 de B. As setas vermelhas indicam os plasmídeos selecionados para o sequenciamento.41

Figura 12 - Eletroforese em agarose dos produtos das 3'RACE PCR e da digestão dos clones obtidos. (A) Gel 1% agarose com os produtos da 3'RACE PCR#1 feitas com o cDNA da HEK293T e A375. Na linha 1 a reação feita com o cDNA sintetizado pelo método de Green e Sambrook (2009), a linha 2 foi com cDNA sintetizados pelo método de Scotto-Lavino (2007), e a linha 3 é com o cDNA de HEK293T. (B) Gel 1% agarose dos produtos da 3'RACE PCR utilizando como template o produto da PCR#1 diluído 1:10. As setas vermelhas indicam as bandas excisadas e posteriormente purificadas. O DNA dessas bandas foi clonado no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. (C) Gel de agarose 1% com as digestões com EcoRI dos clones obtidos com os fragmentos 1, 2 e 3 de B. As setas vermelhas indicam os plasmídeos selecionados para o sequenciamento.43

Figura 13 - Esquema dos transcritos obtidos após PCR 5'RACE e 3'RACE com cDNA das células A375. As seqüências dos clones das ligações pGEM_5RACE.1, pGEM_5RACE.2, pGEM_3RACE.1, pGEM_3RACE.2 e pGEM_3RACE.3 obtidas após o sequenciamento Sanger foram alinhadas com o genoma humano e todos os clones alinharam no locus de RMEL3. Os retângulos representam os éxon e as linhas representam os íntrons. Embaixo de cada éxon está o tamanho em pares de base (pb). Os retângulos verde, ciano, amarelo e laranja representa as regiões dos transcritos que não estão anotadas em bancos de dados e identificadas através dos métodos de 5'RACE e 3'RACE. O tamanho total dos transcritos estão com * pois se trata de transcritos incompletos obtidos com primers internos de RMEL3_201.44

Figura 14 - Amplificação com primers gene específico RMEL3_201 utilizando os cDNAs de células não tumorais e de melanoma. Foram utilizados cDNA das células não tumorais HEK293T e HUVEC e das células de melanoma A375, SKEML28 e WM902B para a amplificação dos transcritos de RMEL3_201 e suas versões com éxon alternativo. (B) Maior aumento das bandas obtidas em A para melhor visualização da diferença na altura das bandas de A375 em relação as demais e das duas bandas acima da terceira banda de A375, que pode corresponder aos transcritos do NONCODING.45

Figura 15 - Análises do locus do RMEL3 a partir de RNAseq e RAMPAGE RNAseq da linhagem de melanoma A375. Utilizando o Genoma Data Viewer do NCBI, analisamos o RAMPAGE RNAseq de A375 (duas primeiras linhas) e RNAseq total de A375 (duas linhas finais). (A) Locus RMEL3 sinalizado com a linha grossa azul no início do quadro, seguido pelos transcritos anotados RMEL3_201 e RMEL3_202, em roxo. Estão destacadas as regiões: (1) TSS do éxon 1 - retângulo preto; (2) Picos correspondentes aos éxons do RMEL3_201 - retângulos azuis; (3) Pico correspondente ao éxon localizado no íntron 1 - retângulo laranja; (3) Pico correspondente ao éxon 1 do RMEL3_202- retângulo verde. (B) Região do éxon 1 do

RMEL3_201: em preto, a região de início de transcrição (TSS) que possui 5 pb; em ciano estão destacados os 26 pb da extensão 5' do éxon 1. (C) Região do íntron 1 do RMEL3_201 com o pico de detecção que corresponde ao éxon final do encontrado por 3'RACE, destacado em laranja. (D) Região destacada do éxon 1 do RMEL3_202 correspondente ao éxon alternativo das isoformas encontradas nos transcritos obtidos por PCR (E) Região do éxon 3 do RMEL3_201 e RMEL3_202 onde está destacado em azul o pico correspondente a esse éxon iniciando 45 nt a jusante do início anotado, e em amarelo, o sinal de RNaseq que corresponde exatamente a região de extensão 3' observado por 3'RACE. (F) Região correspondente ao éxon 4 do RMEL3_201 e RMEL3_202, destacado em azul a sequência do éxon 4 já confirmada nos transcritos obtidos por PCR, e em cinza as duas possíveis extensões do éxon 4 de RMEL3_201.48

Figura 16 - Transcritos confirmados do locus de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 (T-A375_1 a 9). Ilustração do locus do gene RMEL3 e a organização éxon-íntron dos transcritos anotados, RMEL3_201 e RMEL3_202 [éxons (retângulos) e íntrons (linhas)]. Os éxons compartilhados com RMEL3_201 (ENSEMBL) estão coloridos em azul escuro. As regiões ou éxons novos que não fazem parte do canônico estão em: (1) extensão 3' do RMEL3_202, em cinza; (2) extensão 5' do éxon 1; (3) inserção de partes (143, 275-276 ou 258 pb) do éxon 1 do RMEL3_202 na sequência do RMEL3_201; (4) extensão 3' do éxon 3 do RMEL3_201, em amarelo; (5) um éxon novo dentro do íntron 1 do RMEL3_201. As setas representam os primers utilizados para avaliar a expressão geral de RMEL3 por qRT-PCR, e os # sinalizam a região de reconhecimento dos shRNA utilizados no silenciamento de RMEL3. O T-A375_7 não tem confirmação do éxon final, por isso tem * no tamanho do transcrito.50

Figura 17 – Distribuição subcelular de RMEL3 visto por RNA-FISH. Foi realizado a marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 nas linhagens celulares HEK293T, A375, SKMEL29 e WM902B. As células HEK293T foram utilizadas como controle negativo para RMEL3, visto que não expressam esse lncRNA. O núcleo das células foi corado com DAPI. Barra de escala: 10µm52

Figura 18 - Marcação de RMEL3 na célula silenciada com shRNA. A marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 na linhagem de melanoma A375 controle com expressão de RMEL3 (sh LacZ) e na A375 silenciada para RMEL3 (shRMEL3 #4)..... 53

Figura 19 - Os transcritos de RMEL3 estão localizados no citoplasma e núcleo das células A375. Foi realizado a marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 (vermelho) que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 na linhagem A375 O núcleo das células foi corado com DAPI (Azul). As imagens são do corte ortogonal de um Z-stack, as linhas verdes representam o eixo X do corte, e as vermelhas o eixo Y.54

Figura 20 – Nível de silenciamento de RMEL3 promovido pelas shRMEL3 #3 e shRMEL3 #4 nas células A375. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 shRMEL3 #3 e sh RMEL3 #4 e controle (shLacZ) após 48h de indução com 0,5 µg/mL de doxíciclina. Os valores plotados são relativos ao controle sh LacZ. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P<0,0001. (B) Amplificação do RMEL3 por RT-PCR com par de primers GSP1-RMEL3_201. (C) Ensaio clonogênico com A375 shRMEL3 #3 e #4

e controle (shLacZ) (inicial de 500 células). (D) Representação gráfica da contagem de colônias de B. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 réplicas biológicas, ** P< 0,0155

Figura 21 - O silenciamento de RMEL3 reduz capacidade proliferativa e altera ciclo celular em A375. (A) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando shRMEL3 e controle (shLacZ) após cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina (3000 células iniciais) em condições normais de cultivo com o meio suplementado com 10% de soro fetal. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (B) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando shRNAs contra RMEL3 e controle (shLacZ) cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina (3000 células iniciais) sob condições de cultivo pobre em mitógenos (0,5% SFB). O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (C) Porcentagem de células A375 shRMEL3 e controle nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, determinada pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA. As células foram induzidas por 48h com 0,5 μ g/mL de doxíciclina antes da fixação. O gráfico representa a média \pm DP (n=2), (D) Imunodeteção das proteínas Ciclina E2 e γ -Tubulina nas A375 (linha 1-sh LacZ; linha 2-sh RMEL3 #3; linha 3-sh RMEL3 #4). A quantificação densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle sh LacZ são mostradas abaixo das bandas. **** P< 0,0001; *** P<0,001, ** P< 0,01, *P< 0,1 e ns: não significativo.....56

Figura 22 - A superexpressão de RMEL3_201 aumenta capacidade clonogênica da A375. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) após 48h de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina. Os valores plotados são relativos ao controle. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (B) Ensaio clonogênico com A375 pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) (inicial de 300 células). (C) Representação gráfica da contagem de colônias de E. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 réplicas biológicas. **** P< 0,0001; ** P< 0,01.....57

Figura 23 - Superexpressão de RMEL3 aumenta a proliferação em condições de pouco nutriente. (A) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) após cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina (3000 células iniciais) cultivadas em meio suplementado com 10% SFB. (B) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle após cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina cultivadas com meio pobre em mitogênos suplementado com 0,5% SFB. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (C) Porcentagem de células A375 pLENTI-RMEL3 e controle nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, determinada pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA. As células foram induzidas por 48h com 0,5 μ g/mL de doxíciclina antes da fixação. O gráfico representa a média \pm DP (n=2), (D) Imunodeteção das proteínas Ciclina E2 e γ -Tubulina nas A375 (linha 1- pLENTI; linha 2- pLENTI-RMEL3). A quantificação densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle pLENTI são mostradas abaixo das bandas. **** P< 0,0001; ***P<0,001, ** P< 0,01 e ns: não significativo.....58

Figura 24 - Redução das proteínas efetoras ERK1/2 e AKT após o silenciamento de RMEL3. As células A375 shRMEL3 e controle foram privadas de mitógenos do SFB por 72h, e depois foram estimuladas com DMEM 10%SFB e lisadas para avaliação dos níveis proteicos por western blot. (A) Imagem representativa dos Western blots contendo células de lisado total A375 sh LacZ, RMEL3 #3 e RMEL3 #4 obtidas após 0, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após estímulo com DMEM 10% SFB marcados com anticorpos contra ERK1/2

fosforiladas (p-ERK1/2); ERK1/2 total (t-ERK1/2); AKT fosforiladas (p-AKT), AKT total (t-AKT) e GAPDH (usado como normalizador de carga proteica). (B) Representação gráfica da porcentagem de fosforilação de ERK1/2 mostrada em A. O gráfico representa a média±SEM (n=3), **** P< 0,0001. (C) Representação gráfica da porcentagem de fosforilação da AKT mostrada em A. O gráfico representa a média±SEM (n=3), **** P< 0,0001. As porcentagens de fosforilação foram calculadas da seguinte maneira: (densiometria proteína fosforilada/densiometria proteína total)*100. As densiometrias das proteínas de interesse foram normalizadas com a densiometria do GAPDH antes.59

Figura 25 - O silenciamento de RMEL3 aumenta a apoptose em células de melanoma A375. As células A375 sh LacZ e shRMEL3 foram cultivadas em meio de cultura suplementado com 10%SFB nos tempos de 24,48 e 72 horas e então foram analisadas por citometria de fluxo para marcação de Anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio (PI). (A-C) Representação gráfica dos perfis de morte celular das células A375 cultivadas com 10%SFB nos tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Os gráficos representam a média ± DP (n=2), **** P< 0,0001..... 61

Figura 26 – As células A375 silenciadas para RMEL3 possuem perfil pró-apoptótico. Imunodeteção das proteínas BCL2, caspase 3 total, caspase 3 clivada, PARP clivada e γ -Tubulina nas A375 (linha 1- pLENTI; linha 2- pLENTI-RMEL3). A quantificação densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle sh LacZ são mostradas abaixo das bandas. 62

Figura 27 - O silenciamento de RMEL3 juntamente com a privação de soro aumenta a apoptose em células de melanoma A375. As células A375 sh LacZ e shRMEL3 foram cultivadas em meio de cultura sem soro fetal bovino (0%SFB) nos tempos de 24,48 e 72 horas e então foram analisadas por citometria de fluxo para marcação de Anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio (PI). (A-C) Representação gráfica dos perfis de morte celular das células A375 cultivadas com 0% SFB nos tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Os gráficos representam a média ± DP (n=2), **** P< 0,0001..... 63

Figura 28 - O silenciamento de RMEL3 muda os níveis de captação de glicose nas células A375. (A) Quantificação da captação de glicose nas células A375 shRMEL3 e controle nas condições de cultivo com 10% SFB (Com Soro) e em condição de privação (Sem Soro). (B) Quantificação da secreção de lactato das células A375 shRMEL3 e controle nas condições normais de cultivo (10%SFB). (C). Quantificação do lactato intracelular das células A375 sh RMEL3 e controle condições de cultivo com 10% SFB (Com Soro) e em condição de privação (Sem Soro). Os gráficos representam a média ± SEM (n=3), **** P< 0,0001, *** P< 0,001, *P< 0,1. 65

Figura 29 - Ausência de RMEL3 reduz migração e invasão nas células A375. As células A375 shRMEL3 e controle foram privadas de soro por 72h, depois foram desaderidas e plaquedas (1×10^5 células/inserto) em meio simples nos insertos transwell encaixados nos poços com DMEM 10%SFB ao fundo. Após 20h de incubação a 37°C, as células na superfície inferior da membrana foram fixadas, coradas com cristal violeta fotografadas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz invertido na magnificação de 20X (A) Imagens representativas das células A375 shLacZ e shRMEL3 que migraram pela membrana do inserto transwell. (B) Imagens representativas das células A375 shLacZ e shRMEL3 que invadiram a camada de matrigel e ultrapassaram a membrana do inserto transwell. (C) Quantificação das células que migraram pela membrana. As colunas representam a média das células que migraram/campo ± SEM (n=3). (D) Quantificação das células que invadiram a camada de matrigel e ultrapassaram pela

membrana. As colunas representam a média das células que invadiram/campo \pm SEM (n=3). **** P< 0,0001, ** P< 0,01..... 67

Figura 30 - Efeito do silenciamento de RMEL3 na secreção de metaloproteinases de matriz. As células A375 foram cultivadas em meio simples por 24 horas e depois esse meio foi coletado e realizado o ensaio de zimografia em gelatina. (A) Imagem representativa de um gel SDS com gelatina corado com Comassie Blue após ensaio de zimografia. As bandas brancas são oriundas da atividade enzimática das metaloproteinases de matriz MMP9 (82kDa) e MMP2 (62 kDa). (B) Representação gráfica da densitometria das bandas ocasionadas por MMP9 e MMP2. As colunas representam a média de três sobrenadantes diferentes de cada célula \pm SEM (n=3). ** P< 0,01. 68

Figura 31 - O RMEL3 é enriquecido em imunoprecipitados de MST2 e ARAF em células HEK293T superexpressando RMEL3_201. (A) Expressão relativa do transcrito RMEL3_201 na linhagem HEK-293T expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI), os valores plotados são relativos ao controle. O gene TBP foi usado como endógeno com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para normalizar os níveis de expressão. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P< 0,0001. (B) Resumo esquemático do ensaio de RNA-imunoprecipitação (RIP). (C) Imunoprecipitação (IP) de myc-MST2 e ARAF demonstrada por western blot sondado com anti myc (myc-MST2 – 58 kDa) e anti-ARAF (68 kDa). O controle negativo de IgG foi utilizado em ambas as imunoprecipitações (D) qRT-PCR foi realizado nas amostras para avaliar o enriquecimento do transcrito RMEL3 precipitado pelo anticorpo anti-myc e anti-ARAF sobre o Input. O gráfico representa a média \pm DP (n=3), **** P< 0,0001. 70

Figura 32 - RMEL3 pode estar contribuindo para o aumento da interação entre MST2 e ARAF. (A) As células HEK-297T pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) foram transfectadas com pCMV6M-Mst2 (myc-MST2) e pHAGE-ARAF (ARAF) por 48 horas. A proteína myc-MST2 foi imunoprecipitada com anti-myc IgG (9E10) dos lisados do HEK-293T pLENTI-RMEL3 e pLENTI. Myc-MST2 imunoprecipitado foi imunodetectado por western blot com anti-myc. (B) Representação gráfica da quantidade de myc-MST2 relativa ao input mostrado em A. Cada banda da IP anti-myc-MST2 foi normalizada com seu Input (IP/Input). (C) As imunoprecipitados mostradas em A foram imunodetectadas com anti-ARAF para verificar a co-imunoprecipitação de ARAF. (D) Quantificação do nível proteico de ARAF das amostras de co-imunoprecipitados relativo ao input mostrados em C. Cada banda da co-IP anti-ARAF foi normalizada com seu Input (IP/Input). Imagens representativas do Western blot são mostradas. Os dados foram expressos como a média \pm SEM (n=3). 71

Figura 33 - Interação de RMEL3 com as proteínas ARAF, MST2 e FAM83D em melanoma. (A-C) Imunoprecipitação (IP) de ARAF, MST2 e FAM93D demonstrada por western blot sondado com anti-ARAF (67kDa), anti-MST2 (59kDa) e anti-FAM93D (65 kDa). O controle negativo de IgG foi utilizado em todas as imunoprecipitações. (D) qRT-PCR foi realizado nas amostras para avaliar o enriquecimento do transcrito RMEL3 precipitado nas amostras de A,B e C. O enriquecimento de RMEL3 dos RIPs é relativo ao IgG. O gráfico representa a média \pm DP (n=3). 72

Figura 34 - As proteínas ARAF, MST2 e FAM83D são detectadas no pulldown de RMEL3 endógeno. Experimento de *pulldown* de RNA endógeno utilizando probes que reconhecem o RMEL3, e sondas que reconhecem PCA3 como controle negativo. (A) O gráfico representa a média \pm SEM de 2 replicatas biológicas do enriquecimento de RMEL3 após o pulldown (PD). SAMMSON foram utilizados como

controle para aferir a pureza/especificidade do experimento. (B) Imunodeteccção das proteínas de interesse com anti-ARAF (67kDa), anti-MST2 (59kDa) e anti-FAM93D (65 kDa) após *western blot* realizado após o *pulldown*. 73

Figura 35 - Predição da interação de RMEL3 com as proteínas ARAF, MST2 e FAM83D *in silico*. Representação gráfica do perfil de interação Proteína-RNA, com score de interação da proteína de interesse (eixo Y) ao longo da sequência do RNA (eixo X). (A) Controle negativo de interação: Perfil de interação de Rab7 com o RNA myc. (B) Controle positivo de interação: Perfil de interação de SRFS1 com o lncRNA XIST. (C) Perfil de interação de ARAF com o transcrito T-A375_1 (RMEL3 canônico de A375). (D) Perfil de interação de MST2 com o transcrito T-A375_1. (E) Perfil de interação de FAM83D com o transcrito T-A375_1. 74

Figura 36 – Ativação da via de MAPK é reduzida nas células de melanoma A375 silenciadas para RMEL3. Imagem representativa da Imunodeteccção de ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2); ERK1/2 total (t-ERK1/2) e vinculina (normalizador de carga proteica) nos lisados de A375 sh LacZ, RMEL3 #3 e RMEL3 #4 cultivadas com DMEM 10%SBF, cultivadas por 72h em DMEM 0%, estimula com DMEM 10%SBF após 72h de privação. 76

Figura 37 – Análise do sequenciamento em larga escala de RNA das células A375 shRMEL3 #4 comparada a A375 sh LacZ. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 shRMEL3 #4 e controle (shLacZ) das amostras utilizadas para sequenciamento de RNA em larga escala. Os valores plotados são relativos ao controle sh LacZ. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P < 0,0001. (B) Gráfico Volcano exibindo os genes diferencialmente expressos (\log_2 fold change <-1 ou >1; FDR p-value <0,05). (C) *Heatmap* dos exibindo os genes diferencialmente expressos (\log_2 fold change <-2 ou >2; FDR p-value <0,05). 78

Figura 38 – Análise de enriquecimento funcional de DEGs regulados negativamente. (A) Os resultados da análise de anotação GO processo biológico (barras laranja), componente celular (barras verdes) e função molecular (barras pretas) dos DEGs regulados negativamente. (B) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica apresentação de antígeno via MHC de classe II no enriquecimento GO. (C) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica organização da estrutura extracelular no enriquecimento GO. (D) Os resultados da análise de enriquecimento das vias KEGG de DEGs regulados negativamente após silenciamento de RMEL3. A Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA) foi feita no site <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/annotate.jsp>, foram computadas sobreposições dos DEGs regulados negativamente com outros conjuntos de genes no MSigDB. 80

Figura 39 – Análise de enriquecimento funcional de DEGs regulados positivamente. (A) Os resultados da análise de anotação GO processo biológico (barras laranja), componente celular (barras verdes) e função molecular (barras pretas) dos DEGs regulados positivamente. (B) Genes regulados positivamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica apresentação de sinalização de PI3K no enriquecimento GO. (C) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados nas funções biológicas de adesão celular e migração no enriquecimento GO. (D) Os resultados da análise de enriquecimento das vias KEGG de DEGs regulados negativamente após silenciamento de RMEL3. A

Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA) foi feita no site https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/annotate.jsp , foram computadas sobreposições dos DEGs regulados negativamente com outros conjuntos de genes no MSigDB.	83
Figura 40 – RMEL3 regula genes de ativação de linfócitos T, proliferação de células B e apresentação de antígeno via MHC de classe I.	85
Figura 41 - Metabolismo do LPA e a sinalização do receptor LPA. A geração de LPA é catalisada por autotaxina extracelular secretada, e as funções do LPA são induzidas pela ativação de receptores LPA acoplados à proteína G, podendo ativar as vias de sinalização de RhoA, PLC, Ras, PI3K e inibir a via de AC. Adaptada de K. H. Lin et al., 2020.	87
Figura 42 – Vias ativadas pelo ácido lisofosfatídico. (A) Genes regulados por RMEL3 da via do início da sinalização por LPA e (B) que participam da sinalização Rho ativada por LPA. (C) Genes regulados por RMEL3 que atuam na organização do citoesqueleto de actina e (D) migração celular.	88
Figura 43 – Genes relacionados com o programa transcricional induzidos pela resposta a fatores de crescimentos regulados após silenciamento de RMEL3 nas células A375. As células A375 shRMEL3 #4 e controle shLacZ foram estimuladas por 4 horas com 10% de soro fetal bovino, depois o RNA foi extraído para análise por sequenciamento em larga escala. Representação gráfica dos genes alterados e do Log ₂ Fold Change em: (A) Os genes precoces e imediatos alterados nas células A375 shRMEL3 #4 comparados com os da célula de glioblastoma T89G.; (B) Genes de resposta primária atrasada e em (C) genes de resposta secundária.	91
Figura 44 - Mapa da via de sinalização de PI3K-AKT (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.	93
Figura 45 – Mapa da via Ciclo Celular (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.	94
Figura 46 - Mapas das vias Interação de receptores com a matriz celular e Adesão Focal (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.	95
Figura 47 – Distribuição dos genes regulados no silenciamento de RMEL3 no metabolismo dos principais componentes celular. Em destaque na coluna de metabolismo de carboidratos estão os genes subexpressos (azul) e superexpressos (vermelhos) da via da glicólise.	96
Figura 48 – Mapas da via supressora tumoral Senescência (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.	97
Figura 49 – Mapas da via supressora tumoral FOXO (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.	98
Figura 50 – Genes localizados no cromossomo 5 q11.2 regulados por RMEL3. (A) Em destaque os genes anotados para a região q11.2 do cromossomo 5, a região onde está localizada o RMEL3. Em verdes são os	

lncRNAs e miRNA, em azul os genes codificantes e em vermelho genes não caracterizados. (B) Genes codificantes e de lncRNA do chr5 q11.2 regulados por RMEL3. * indica genes com p-value <0,05, mas com FDR p-value >0,05. 100

Figura 51 - Efeitos da expressão de RMEL3 nas células de melanoma A375. Ilustração criada no Biorender.com. 111

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para qRT-PCR.....	21
Tabela 2 - Primers utilizados na síntese do cDNA e nas ampliações do 3'RACE.	23
Tabela 3 - Primers utilizados na síntese do cDNA <i>Template-Switching</i> e nas ampliações do 5'RACE.	25
Tabela 4 - Sondas utilizadas para RNA-hibridização <i>in situ</i> de RMEL3.....	27
Tabela 5 - Sequências dos shRNAs utilizados para o silenciamento do gene da RMEL3.....	28

1. Sumário

AGRADECIMENTOS PESSOAIS.....	i
AGRADECIMENTOS PROFISSIONAIS.....	ii
RESUMO	iii
ABSTRACT	iv
LISTA DE FIGURAS	v
LISTA DE TABELAS	xiv
1. Sumário.....	xv
I. Introdução.....	1
1. Melanoma	1
1.1 Incidência.....	2
1.2 Bases Moleculares do Melanoma Cutâneo.....	4
1.3 Principais estratégias terapêuticas	10
2. RNAs longos não codificantes – lncRNA	13
3.1 lncRNA <i>Restricted to Melanoma 3</i> – RMEL3	15
2. Objetivos.....	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. Metodologia.....	20
3.1 Cultivo Celular.....	20
3.2 Purificação de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR	20
3.3 Síntese cDNA, RT-PCR e PCR – 3’RACE	21
3.4 Síntese do cDNA <i>Template-switching</i> e PCR – 5’RACE.....	24
3.5 Clonagem dos fragmentos RACE no plasmídeo de sequenciamento pGEM..	26
3.6 Hibridização in situ por fluorescência de RNA (RNA-FISH).....	26
3.7 Produção de partículas lentivirais e transdução da A375	27
3.8 Ensaio Clonogênico	28

3.9	Ensaio de proliferação	28
3.10	Ensaio de migração com inserto <i>transwell</i>	29
3.11	Ensaio de invasão celular em matriz extracelular	29
3.12	Análise do ciclo celular por coloração do DNA com iodeto de propídio	30
3.13	Avaliação da morte celular por marcação de Anexina-V e iodeto de propídeo 30	
3.14	Ensaio para detecção de metabólitos	31
3.15	Imunodeteção de proteínas – Western Blot.....	31
3.16	<i>Pulldown</i> do RMEL3	32
3.17	RNA-Imunoprecipitação	33
3.18	Sequenciamento em Hi-seq 2500 Illumina.....	34
3.19	Análise de enriquecimento funcional de DEGs.....	35
4.	Resultados.....	36
4.1	Os transcritos do locus de RMEL3	36
4.1.1	Identificação de dois éxons novos de RMEL3 não anotados em bancos de dados.....	40
4.1.2	Validação dos transcritos de RMEL3 com dados de RNAseq do ENCODE	46
4.2	Distribuição subcelular dos transcritos de RMEL3	50
4.3	A expressão de RMEL3 afeta importantes fenótipos tumorais em A375	54
4.3.1	O silenciamento de RMEL3 prejudica a capacidade clonogênica e proliferação	54
4.3.2	A fosforilação de ERK1/2 e AKT, proteínas efetoras das vias de MAPK e PI3K reduz com o silenciamento de RMEL3	59
4.3.3	O silenciamento de RMEL3 aumenta a morte celular em A375	60
4.3.4	A ausência de RMEL3 nas células A375 afeta a captação de glicose e aumenta o lactato intracelular	64
4.3.5	O silenciamento de RMEL3 reduz a capacidade migratória e invasiva das células A375	66

4.4 Validação da interação de RMEL3 com proteínas da via de MAPK e Hippo	69
4.4.1 RMEL3_201 expresso em HEK293T interage com as proteínas ARAF e MST2	69
4.4.2 RMEL3 endógeno possui interação com ARAF, MST2 e FAM93D em A375	71
4.5 O silenciamento do RMEL3 altera o perfil de expressão gênica nas células A375	75
4.5.1 Enriquecimento funcional dos DEGs detectados no silenciamento de RMEL3	79
4.5.2 RMEL3 regula a expressão de importantes genes da resposta imunológica .	84
4.5.3 Silenciamento de RMEL3 levou a alteração na expressão de genes associados a via de LPA e migração celular.....	86
4.5.4 Vias moleculares clássicas de melanoma são reguladas pelo silenciamento de RMEL3	89
4.5.5 RMEL3 pode estar modulando a expressão de genes localizados na mesma região cromossômica	98
5. Discussão	101
6. Conclusão	112
7. Referências	113
8. Apêndice.....	128
Anexo 1 – Sequenciamento dos transcritos obtidos por RT-PCR com primer específico RMEL3_201.	128
Anexo 2 - Sequenciamento dos transcritos obtidos por 5'RACE PCR.....	131
Anexo 3 - Sequenciamento dos transcritos obtidos por 3'	133
Anexo 4 – Resultados técnicos sequenciamento em larga escala – RNAseq das amostras de A375 shRMEL3 e A375 sh LacZ.....	135
Tabela suplementar 1 - 20 regiões de ARAF com maior interação com RMEL3 (T-A375_1).....	136

Tabela suplementar 2 - 20 regiões de MST2 com maior interação com RMEL3 (T-A375_1).....	136
Tabela suplementar 3 - 20 regiões de FAM83D com maior interação com RMEL3 (T-A375_1).....	137
Tabela suplementar 4 - Lista de genes identificados como diferencialmente expressos (log ₂ fold change <-1 ou >1; FDR p-value <0,05) no sequenciamento em larga escala das células A375 shRMEL3 #4/A375 shLacZ estimulas 4h com 10%SFB após privação de mitógenos por 72h.....	138
Tabela suplementar 5 – Vias moleculares GO (Gene Ontology) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) dos genes subexpressos (FDR p-value <0,05 e log ₂ fold change <-2) nas células A375 shRMEL3 #4.....	155
Tabela suplementar 6 - Vias moleculares GO (Gene Ontology) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) dos genes superexpressos (FDR p-value <0,05 e log ₂ fold change >2) nas células A375 shRMEL3 #4.....	157

I. Introdução

1. Melanoma

O melanoma é o câncer de pele oriundo da transformação maligna dos melanócitos, células produtoras de melanina da pele, olhos, epitélios das mucosas e meninges que são responsáveis pela pigmentação e fotoproteção (B. K. Sun et al., 2014). O melanoma cutâneo foi descrito como um dos cânceres mais imunogênicos com características histológicas e clínicas heterogêneas e um número significativo de mutações, o que explica a baixa taxa de regressão tumoral, resistência a múltiplas drogas a terapias direcionadas e taxa de sobrevida reduzida (Coricovac et al., 2018).

Embriologicamente, os melanócitos são derivados da crista neural e colonizados na pele, nos olhos e em diversos tecidos durante o desenvolvimento. A proliferação aumentada benigna é comumente observada e resulta em nevos melanocíticos. Com a presença de diversas mutações, aberrações, translocações e deleções, entretanto, pode ocorrer transformação maligna, dando origem a vários tipos de melanomas (Dimitriou et al., 2018; W. Guo et al., 2021).

A classificação tradicionalmente feita para o melanoma é com base na localização do tumor primário. O melanoma cutâneo (MC) geralmente surge de melanócitos residentes da camada epidérmica da pele e, menos frequentemente, da camada dérmica (Scolyer et al., 2011). O melanoma acral (MA) origina-se na pele glabra das palmas das mãos, plantas dos pés e leito ungueal. O melanoma da mucosa (MM) surge de melanócitos no revestimento da mucosa de tecidos internos, como os tratos nasossinusal, anorretal e vulva-vaginal (Rabbie et al., 2019). Melanoma ocular é um termo geral que pode ser dividido em melanoma uveal (MU), que se desenvolve a partir de melanócitos no trato uveal (íris, corpo ciliar e coróide) do olho, e melanoma conjuntival (MCj), que se origina de melanócitos na camada basal do epitélio da membrana conjuntival (van Poppelen et al., 2020). O melanoma desmoplásico (MD) é uma variante histológica relativamente rara do melanoma cutâneo, e é formado por células tumorais fusiformes circundadas por uma espessa matriz fibrosa de colágeno, e ocorre tipicamente na pele cronicamente exposta ao sol de indivíduos mais velhos (Nicolson & Han, 2019).

Em 2018, a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou sua classificação de melanoma com base em características clínicas, histológicas, epidemiológicas e genômicas. Os melanomas foram primeiro divididos em danos solares cumulativos –

CDS (*Cumulative Solar Damage*) versus não consistentemente associados a CSD (*no* CSD) e melanoma nodular (pode ocorrer em qualquer um dos dois). Melanomas associados com CSD foram divididos em baixo (*low*-CSD) e alto (*high*-CSD) pelo grau histopatológico de elastose solar da pele circundante à lesão. Os melanomas de *low*-CSD são tipicamente do subtipo histopatológico de melanoma de espalhamento superficial (MES), enquanto os melanomas de *high*-CSD incluem melanoma lentigo maligno (MLM) e MDs. A categoria de melanoma *no*-CSD inclui melanomas acral, de mucosa e uveal (Figura 2) (Elder et al., 2020).

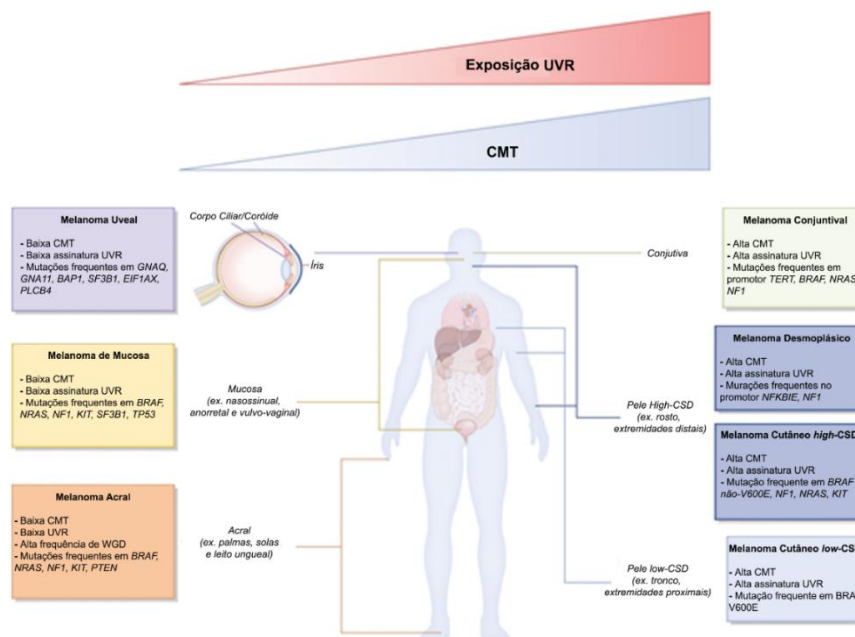


Figura 1 - Representação esquemática da localização anatômica dos subtipos de melanoma e a relevância dada exposição à radiação ultravioleta e carga de mutação tumoral, bem como as mutações mais frequentes e características genômicas de cada subtipo. Siglas: CSD, dano solar cumulativo; TMB, carga mutacional do tumor; UVR, radiação ultravioleta; WGD, duplicação de todo o genoma. Adaptado de Oba e Woodman, 2017.

1.1 Incidência

O melanoma é o 19º câncer mais frequente no mundo e sua incidência está aumentando mais do que para qualquer outro câncer sólido nas últimas décadas, de tal modo que uma duplicação das taxas de incidência é esperada nos próximos vinte anos (Leiter et al., 2020). Para os cânceres de pele melanoma, foram estimados, em 2020, 325 mil (1,7%) casos novos, com 175 mil casos novos em homens (3,80 por 100 mil) e 151 mil novos casos em mulheres (3,00 por 100 mil). As maiores taxas de incidência do câncer

de pele não melanoma estão na Austrália, na Nova Zelândia, na América do Norte e nos países da Europa Ocidental, tanto para homens quanto para mulheres (Sung et al., 2021). Para 2025, estima-se que haverá um aumento de cerca de 20% na mortalidade e no número de casos novos por melanoma. Para 2040, estima-se que o número de casos mundiais diagnosticados chegue quase meio milhão e o número de mortes a mais de cem mil (*International Agency for Research on Cancer, WHO, 2020*).

Segundo a Instituto Nacional do Câncer - INCA (De et al., 2023), no Brasil o número de casos novos de melanoma estimados, para cada ano do triênio 2023-2025, é de 8.980, o que corresponde a um risco de 4,13 por 100 mil habitantes, sendo 4.640 em homens e 4.340 em mulheres. Esses valores correspondem a um risco estimado de 4,37 casos novos a cada 100 mil homens e 3,90 a cada 100 mil mulheres. Para o câncer de pele melanoma, ocorreram, em 2020, 1.923 óbitos. Em homens, foram observados 1.120 óbitos, com um risco de 1,08 por 100 mil homens, e, nas mulheres, ocorreram 803 óbitos, com risco de 0,91 por 100 mil mulheres.

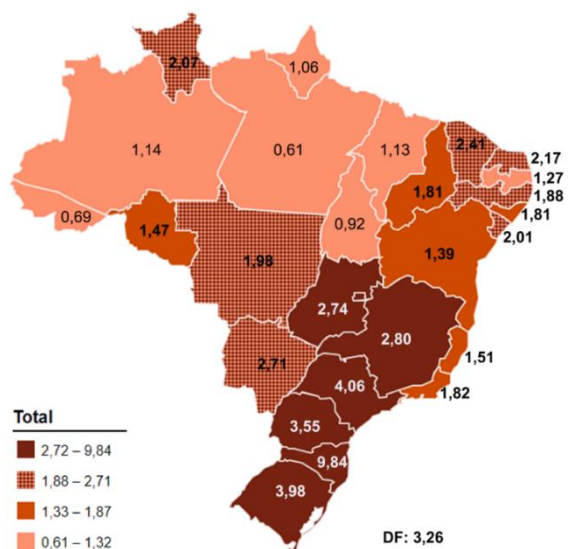


Figura 2 - Distribuição espacial das taxas ajustadas de incidência por 100 mil habitantes, estimadas para o ano de 2023, segundo Unidade da Federação (melanoma maligno da pele). Adaptado de De et al., 2023.

Na região Sul, o melanoma é mais incidente quando comparado as demais regiões do país, sendo Santa Catarina o estado com a maior incidência com uma taxa estimada de casos de 9,84 casos para cada 100 mil habitantes (Figura 2) (De et al., 2023). A região oeste do estado de Santa Catarina apresenta incidência e prevalência superior às estimativas propostas pelo INCA. Isso se deve às características fenotípicas da população, que é composta em sua maioria por descendentes de europeus com fototipos I e II. Também

pode estar correlacionado aos hábitos de vida dos indivíduos dessa região, como a exposição solar contínua ou intermitente sem o uso de protetor solar causando queimaduras, principalmente na infância. Outra hipótese é que haja alta incidência de radiação UV nessa região devido à sua localização no sul do Brasil, como é o caso dos países da Oceania, que possuem alta radiação UV e maior incidência de MC ((De Melo et al., 2018; Moreno et al., 2012).

1.2 Bases Moleculares do Melanoma Cutâneo

Com o advento da tecnologia de sequenciamento do genoma, atualmente é possível uma caracterização genômica e molecular de cada subtipo de melanoma com base em exoma total e/ou análise de sequenciamento de genoma completo (Oba & Woodman, 2021). Os melanomas possuem uma carga mutacional particularmente alta (>10 mutações/ megabase) e abrigam um alto número de mutações de assinatura ultravioleta, como transições C→T (causadas por ultravioleta B) ou G→T (causadas por ultravioleta A). Embora se suponha que muitas mutações patogênicamente relevantes no melanoma se originam de um efeito mutagênico direto do UV-B e do UV-A, efeitos indiretos, como a produção de radicais livres resultantes da interação bioquímica de o UV-A com melanina também causa mutações e aberrações genéticas (Schadendorf et al., 2018).

As mutações somáticas mais recorrentes em melanomas CSD e não-CSD afetam genes das principais vias que determinam fenótipo tumoral, como as sinalizações que governam a proliferação (BRAF, NRAS e NF1), crescimento e metabolismo (PTEN e KIT), identidade celular (domínio de interação rico em AT2 – ARID2), resistência à apoptose (TP53), controle do ciclo celular (inibidor 2A da quinase dependente de ciclina (CDKN2A), que codifica p16^{INK4A} e p14^{ARF}) e tempo de vida replicativo (telomerase transcriptase reversa – TERT) (Figura 1) (Hunter Shain & Bastian, 2016).

A análise de 333 amostras de tumores de melanoma cutâneo do banco de dados *Cancer Genoma Atlas* (TCGA) resultou em uma estrutura para classificação genômica em quatro subtipos com base em mutações gênicas ativadoras, ou conhecidas com *drivers*: BRAF-mutante (50% – 70% dos melanomas), NRAS/KRAS/HRAS-mutante (15% – 25% dos melanomas), perda de NF1 (15% dos melanomas) e triplo selvagem (melanomas sem mutação em nenhum dos genes – 10%), sendo essas mutações quase sempre mutuamente exclusivas (Naik, 2021). Os três genes frequentemente mutados em melanoma codificam componentes da cascata clássica das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK/ERK). A mutação em qualquer um dos três genes, BRAF, RAS e NF-1, é ativadora da via MAPK, no entanto, enquanto BRAF e RAS são oncogenes, NF-1 é um supressor de tumor que codifica uma RAS-GAP, responsável pela inativação de RAS (Akbari et al., 2015; Lim et al., 2017a)

A progressão metastática do melanoma é guiada por mutações secundárias que conferem as células em transformação capacidade de migração e invasão, entre outras. Um exemplo clássico é o aumento nas mutações do promotor TERT em metástases em comparação com melanomas primários, o que representa um fator prognóstico independente (Gandini et al., 2021). Outro driver fenotípico da metástase inclui a regulação de proteínas anti-apoptóticas, como a expressão de BCL-2, que diminui progressivamente da fase de crescimento do tumor radial para a fase de crescimento vertical do tumor, enquanto aumenta os níveis de expressão de MCL1, BCL-XL, XIAP (Hartman & Czyz, 2013).

O papel dos fatores de diferenciação na metástase é amplamente controlado pelo fator de transcrição associado à microftalmia (MITF) e pela sinalização WNT canônica. O MITF é um fator de transcrição central para a sobrevivência, proliferação e produção de pigmento de melanina. 40 A amplificação do MITF foi encontrada em 21% das metástases em comparação com 10% dos melanomas primários. A sinalização do WNT por meio da β -catenina promove a diferenciação melanocítica por meio da regulação positiva transcricional direta do MITF (Gelmi et al., 2022).

1.2.1 Via de MAPK e PI3K no melanoma

O melanoma e o câncer de mama frequentemente abrigam alterações genéticas associadas às vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K que muitas vezes levam à regulação positiva da ativação. Em condições fisiológicas, essas vias conectam sinais extracelulares ao núcleo celular, o que leva à expressão de genes que regulam processos fundamentais, incluindo proliferação, motilidade, diferenciação e morte celular, essenciais tanto durante embriogênese como para a homeostase tecidual no organismo adulto.

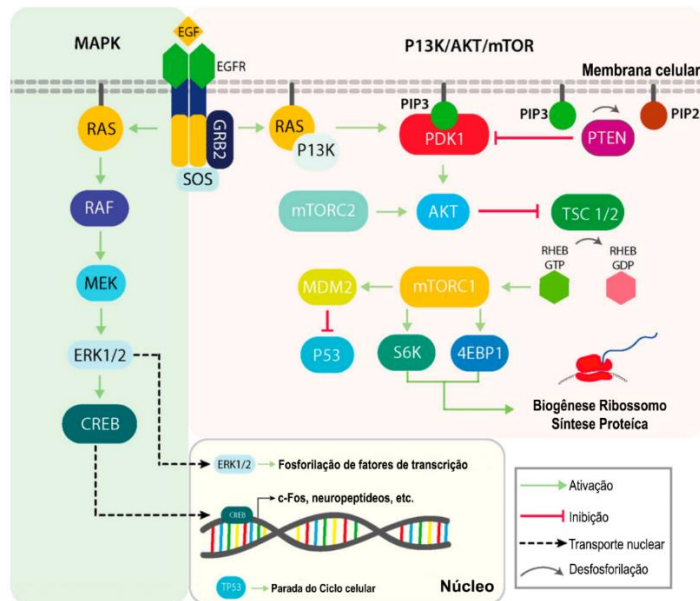


Figura 3 - Vias de sinalização MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR. A via canônica da MAPK/ERK inicia com um estímulo extracelular na forma de fatores de crescimento (FCs) que se ligam e ativam o receptor tirosina quinase (RTKs) na membrana celular. Ativação *downstream* de RAS, RAF e MEK, nessa ordem, convergem na ativação do ativador do fator de transcrição ERK1/2. A cascata P13K/AKT/mTOR também pode ser ativada via RTKs e RAS, e suas principais implicações estão relacionadas à sinalização metabólica e à síntese de proteínas que sustentam o crescimento celular. Adaptado de Braicu et al., 2019.

A ativação da via de MAPK (Figura 3 – Lado Esquerdo) inicia com a interação de um ou mais fatores de crescimento (FCs) com receptores tirosina quinase (RTK), que promove a ativação da RAS GTPase com a ajuda da GEF SOS1 associado ao RTK. A ativação de RAS ocorre após SOS1 promover a troca rápida da Guanosina Difosfato (GDP) em Guanosina Trifosfato (GTP), fazendo com que RAS-GDP (forma inativa) passe a ser RAS-GTP (forma ativa). A RAS-GTP recruta para membrana seus principais efetores, as proteínas RAF. As RAS-GTP favorecem a agregação de membros específicos da família RAF (ARAF, BRAF e CRAF) para formar homodímeros ou heterodímeros ativos de quinase (Adariani et al., 2018).

Os dímeros RAF fosforilam duas MEKs específicas entre os sete genes MEK presentes no genoma dos mamíferos - ou seja, MAP/ERK Quinase 1 (MEK1/MAP2K1) e MEK2/MAP2K2. As proteínas MEK1/2, por sua vez, catalisam uma fosforilação dupla em resíduos de treonina e tirosina de uma sequência específica de tripeptídeo (Thr-Glu-Tyr) da proteína quinase 1 regulada por sinal extracelular (ERK1/MAPK1) e ERK2/MAPK2. Tanto MEK quanto ERK1/2 estão envolvidos em uma ampla gama de processos, como sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, todos dependentes dos alvos fosforilados de MEK e ERK1/2, respectivamente. ERK1/2 exibe especialmente variabilidade em seus alvos de fosforilação, independentemente da localização e

compartimento celular. No núcleo, ERK1/2 pode ativar fatores de transcrição, como CREB, bem como c-Myc e NF- κ B (Braicu et al., 2019).

As proteínas RAF não atuam somente como quinases centrais da via da MAPK. A ARAF e a CRAF exercem uma interação inibitória sobre a Serina-Treonina Quinase 3 (MST2), impedindo sua atividade pró-apoptótica (O'Neill et al., 2004; Rauch et al., 2010, 2016). A quinase MST2 é um dos principais componentes da via supressora tumoral Hippo, via que desempenha papéis fundamentais em vários processos biológicos, como homeostase tecidual, controle do tamanho de órgãos, metástase, resposta imune e mecanotransdução (V. Fu et al., 2017). Após o estímulo dessa via, MST1/2 fosforila LATS1/2, SAV1 e MOB1, o que leva a formação de um complexo e ativação total das LATS1/2 quinases, que por sua vez fosforila as oncoproteínas YAP e TAZ, que atuam como co-ativadores transcricionais. Quando fosforiladas, YAP e TAZ ficam inibidas e retidas no citoplasma, perdendo assim sua sublocalização nuclear, e consequentemente impedindo a interação com fatores de transcrição, como TEAD (Azad et al., 2019; Zanconato et al., 2015).

Outro papel quinase-independente de CRAF é regulação do citoesqueleto durante a migração, através da interação com a proteína Rho ROCK2. Estudos recentes mostraram que a ligação de CRAF a ROCK2 reduz a atividade quinase de ROCK2, atividade essa essencial para a regulação adequada da adesão e migração em vários tipos de células, incluindo o bloqueio da diferenciação de queratinócitos induzida por ROCK durante a tumorigênese epidérmica e modulando a atividade de ROCK2 nas junções endoteliais vasculares (VE)-caderina durante a angiogênese induzida por tumor (Soriano et al., 2021).

Outra importante via alterada no MC, iniciada após estímulo por fatores de crescimento e fatores de sobrevivência, é a via de sinalização PI3K (Fosfatidilinositol 3 quinase) – AKT – mTOR (Proteína alvo da rapamicina em mamíferos) (Figura 3 – lado direito). O complexo mTOR (mTORC1) responde a fatores de crescimento, metabolismo energético, disponibilidade de aminoácidos e estresse celular. A ativação da via de PI3K-AKT pode ocorrer de duas formas: interação direta com RTKs ativados por fatores de crescimento/sobrevivência ou ativada por mitógenos, como PDGF e EGF, e seus respectivos RTKs, através da ativação de RAS. Iniciada a cascata de sinalização, RAS-GTP promove a ativação da PI3K, que por sua vez realiza a conversão fosfatidilinositol (4,5)-bifosfato (PIP2) a fosfatidilinositol (3,4,5)-trifosfato (PIP3), que posteriormente é desfosforilada pela fosfatase e homólogo de tensina deletado no cromossomo 10 (PTEN),

uma lipídio-proteína fosfatase. O PIP3 se liga ao domínio de homologia pleckstrina (PH) da serina/treonina quinase AKT facilitando o encaixe de AKT na membrana celular, onde é ativado via fosforilação por mTORC2 no resíduo S473 e pela quinase dependente de fosfoinosítídeo 1 (PDK1) em T308. A AKT pode, portanto, ser regulado positivamente por PI3K e negativamente regulado por PTEN. Portanto, a perda de PTEN e/ou mutações de PIK3CA resultam na ativação constitutiva de AKT/mTOR, que foi documentada em vários tipos de câncer (Kezic et al., 2018).

Como sabemos, no contexto fisiológico as vias de sinalização se regulam ou de maneira positiva ou negativa. No caso das vias de MAPK/ERK e PI3K/AKT/mTOR ocorre uma regulação recíproca, podendo ser inibitória ou indutora (Braicu et al., 2019). No contexto do melanoma, as vias PI3K/AKT/mTOR e MAPK/ERK cooperam para o crescimento do tumor, além de interagirem entre si, e a hipersinalização de uma via de sinalização pode intensificar ou inibir outra via.

1.2.2 Mutações no gene driver BRAF

O BRAF é um membro da família das serina/treonina-quinases (ARAF, BRAF e CRAF), as quais são quinases citosólicas nomeadas com base no fenótipo de “rapidly accelerated fibrosarcoma” (RAF) causado pelo oncogene viral v-RAF murino. A estrutura molecular das proteínas da família RAF são compreendidas em três regiões conservadas: região conservada (CR) 1 (localizada nos aminoácidos (aa) 61–194), CR2 (aa 254–269) e CR3 (aa 335–627). A CR1 está localizada no terminal amino, é rico em cisteína e contém uma estrutura semelhante a um dedo de zinco e funciona como um auto-inibidor do domínio BRAF quinase (CR3), garantindo que a sinalização seja regulada. CR1 é o principal local de ligação de RAS-GTP nas RAFs. A CR2 é uma região rica em resíduos de serina e treonina, e atua como uma dobradiça flexível entre CR1 e CR3. A porção N-terminal de CR3 está envolvida na ligação de ATP; ela contém a região P-loop que é importante para estabilizar a ligação do ATP e manter uma conformação BRAF inativa (Dankner et al., 2018)

O gene de BRAF foi caracterizado como um oncogene e potencial alvo terapêutico em 2002, após a triagem de todo o genoma humano (Davies et al., 2002). Atualmente, sabe-se que mutações em BRAF estão presentes em cerca de 8% dos cânceres humanos. O melanoma e os cânceres de tireoide têm a maior frequência de mutações BRAF, já que aproximadamente 30 – 70% dos melanomas e 50% dos cânceres papilíferos de tireoide

abrigam mutações no BRAF (Halle & Johnson, 2021). Estudos recentes classificaram os mutantes BRAF em três classificações com base em três importantes aspectos bioquímicos e de sinalização: (I) atividade de quinase, (II) dependência de RAS e (III) status de dimerização (Yao et al., 2017)

Cerca de 30 mutações de BRAF foram identificadas em tumores, sendo a grande maioria no éxon 15, local de codificação do sítio de ativação da proteína BRAF. No contexto do melanoma, 90% das mutações BRAF envolvem o códon 600 (V600), e 80% dessas mutações é a troca da valina por um ácido glutâmico (V600E). No entanto, V600K (troca de valina por lisina) é a segunda mutação mais comum, constituindo 14-28% das mutações BRAF subjacentes ao melanoma (Hussain et al., 2015).

As mutações BRAF V600 são referidas como mutantes de classe I, um grupo que resulta em forte ativação da atividade quinase de BRAF e ativação constitutiva da via MAPK. O feedback negativo em RAS, resultado da ativação constitutiva da MAPK, previne a dimerização de BRAF e facilita um ambiente onde as proteínas BRAF mutantes V600 sinalizam constitutivamente como monômeros (Ritt et al., 2010). Estruturalmente, a mutação V600E aumenta a atividade de BRAF formando uma ponte salina com K507 na porção C-terminal da hélice α C. Isso força o segmento de ativação a se dobrar para trás em direção a uma conformação ativa. A interação entre V600E e K507 imita as mudanças conformacionais que ocorrem durante a dimerização, fornecendo uma explicação do porquê o BRAF V600E não depende da dimerização para aumentar a atividade da quinase (Thevakumaran et al., 2014).

A alta incidência de mutações em BRAF em melanoma está relacionada com a importância dessa proteína na biologia dos melanócitos, nos quais o Hormônio Estimulante de Melanócitos, α -melanocortina (α -MSH), ativa BRAF na cascata de sinalização da ERK, promovendo a proliferação celular (Zaidi et al., 2020). A mutação BRAF^{V600E} não está somente relacionada com a ativação de MEK/ERK, a sua participação está relacionada com diferentes mecanismos de progressão do melanoma: como evasão da senescência e apoptose; potencial replicativo não controlado; angiogênese através da ativação de HIF-1 α e VEGF promovida por MEK; reprogramação do metabolismo celular através da supressão do programa de genes de fosforilação oxidativa; invasão tecidual e metástase por meio da regulação positiva de várias proteínas relacionadas com migração; sinalização de integrinas, contratilidade celular, interleucina-8 (IL-8) derivada de tumor e microambiente; bem como a evasão da resposta imune (Alqathama, 2020; Tian & Guo, 2020).

Devido a ampla atuação de BRAF no contexto celular, os pacientes que têm melanoma com a mutação BRAF^{V600E} possuem um câncer mais agressivo e com pior prognóstico (Ascierto et al., 2012). Esses achados suportam o papel potencial de estratégias terapêuticas direcionadas no melanoma que abriga a mutação BRAF que são bastante comuns nos dias de hoje. Além disso, inibidores de BRAF^{V600E} aumentam a imunogenicidade do tumor, permitindo tratamentos combinados com imunoterapias, fomentando ainda mais investimentos nessas diretrizes (Braicu et al., 2019).

1.3 Principais estratégias terapêuticas

A maioria dos pacientes com melanoma recém-diagnosticado apresenta doença em estágio inicial. Para esses pacientes, a excisão cirúrgica representa o tratamento de escolha e é curativa na maioria dos casos. No entanto, alguns pacientes recidivarão posteriormente com doença disseminada. Aproximadamente 10% dos casos de melanoma são diagnosticados em estágio avançado e irremediáveis ou já metastáticos. Entre os tumores de estágio IV, aproximadamente um terço tem envolvimento visceral e cerebral no momento do diagnóstico, com prognóstico grave e menor probabilidade de ter uma resposta sustentada ao tratamento (Naik, 2021).

Para pacientes em estágio avançado da doença, o tratamento do melanoma foi revolucionado desde 2011, com a aprovação de vários agentes terapêuticos. Esses agentes incluem inibidores das quinases RAF e MEK, bem como os inibidores de *check-point* imunológico: anticorpo anti-Antígeno-4 associado a linfócitos T citotóxicos – anti-CTLA4) e anticorpo anti-Proteína de morte celular programada 1 – anti-PD1 (Tian & Guo, 2020). De fato, no cenário de estágio avançado, anticorpos anti-PD1 e anti-CTLA4 (como nivolumab, pembrolizumab e ipilimumab), bem como inibidores seletivos de BRAF (vemurafenib e dabrafenib) sozinhos e/ou em combinação com inibidores de MEK (cobimetinib e trametinib) mostraram resultados promissores em ensaios clínicos e já são uma importante estratégia terapêutica (Vancoppenolle et al., 2023).

BRAF^{V600E} por ser a mutação oncogênica mais comum em melanomas cutâneos levou a busca de um inibidor de quinase altamente com valor terapêutico. Na clínica são comumente utilizados alguns inibidores seletivos de BRAF: vemurafenib, dabrafenib e encorafenib. Esses inibidores de quinase foram projetados para se ligarem especificamente à bolsa de ligação de ATP da conformação ativa de BRAF, com preferência para BRAF^{V600E}, levando a maior potência e especificidade da inibição (Tsai

et al., 2008). Apesar das vantagens de sobrevida observadas no tratamento com BRAFi em relação à quimioterapia, aproximadamente metade de todos os pacientes tratados com BRAFi apresentaram progressão da doença dentro de 6 a 7 meses após o início do tratamento (Hauschild et al., 2012; Sosman et al., 2012).

Múltiplos mecanismos genéticos e não genéticos contribuem para a falha do tratamento, geralmente levando à reativação da via MAPK. Essa grande variedade de mecanismos de resistência é possível devido à heterogeneidade subjacente e pela plasticidade das células do melanoma. A resistência a medicamentos é um fenômeno multifacetado e um cenário complexo envolvendo alterações genéticas, epigenéticas e metabólicas dentro das células tumorais, bem como no microambiente tumoral. Os mecanismos de resistência a BRAFi podem ser caracterizados em: (1) resistência intrínseca; (2) resposta adaptativa e tolerância a fármacos; (3) resistência adquirida (Proietti et al., 2020).

Alterações genéticas pré-existentes e fatores secretados endogenamente de células estromais ou tumorais foram identificados como impulsionadores da resistência intrínseca à inibição de BRAF em algumas linhas celulares e tumores de melanoma mutante BRAF^{V600E}. Um exemplo dessas alterações são as mutações e deleções endógenas de PTEN que são frequentemente identificadas em melanomas BRAF^{V600E} (Catalanotti et al., 2017). A perda de PTEN confere resistência intrínseca ao suprimir a apoptose mediada por BIM. Outras alterações pré-existentes e que contribuem para resistência intrínseca são: amplificação do gene CCND1, que codifica a ciclina D1, presente em 17% dos melanomas BRAF^{V600E} (Smalley et al., 2008); mutação ativadora em Rho GTPase RAC1 (RAC1^{P29S}), presente em 50% dos melanomas BRAF^{V600E} (Krauthammer et al., 2012); mutação ativadora em MEK1 (MEK1^{P124}), presente em 5% dos melanomas BRAF^{V600E} e que confere resistência tanto a BRAFi como inibidores de MEK (Carlino et al., 2015); perda de NF1 e mutações de NF1 foram observadas em células tumorais mutantes de BRAF intrinsecamente resistentes à inibição de RAF (Whittaker et al., 2013).

Outro mecanismo de resistência que ocorre em melanomas é surgimento de mecanismos compensatórios induzidos por BRAFi, ou respostas adaptativas, que aumentam a capacidade pró-sobrevivência e pró-proliferativa de uma proporção da população tumoral original. Exemplos desse mecanismo é a perda de loops de feedback negativo de ERK (Germann et al., 2017); transição de estado celular de proliferativo para invasivo, como redução da expressão de MITF e aumento da expressão de AXL (Haq et

al., 2013). A resistência adquirida ocorre em cerca de 50% dos pacientes tratados apenas com BRAFi ou em combinação com MEKi experimentam um encolhimento inicial significativo do tumor, seguido de crescimento do tumor. Na resistência adquirida ocorre a reativação da via MAPK, com o aumento da expressão de RTK como AXL, EGFR, PDGFR β e JUN (Shaffer et al., 2017); mutação em NRAS, ocorre em 5-18% dos melanomas resistentes (Johnson et al., 2015), mutações MEK1 dentro do éxon 3 ou 6 conferem resistência à inibição de BRAF (Johnson et al., 2015); amplificação de BRAF^{V600E} (Tangella et al., 2021); aumento da expressão de COT (MAP quinase MAP3K8) (Johannessen et al., 2010).

A fim de reduzir os riscos de resistência à monoterapia com BRAFi, atualmente na clínica se opta pelo uso de terapias combinadas. A maioria das opções de combinação atualmente aprovadas inclui um inibidor de BRAF e MEK. A inibição dupla de BRAF *upstream* e MEK quinases *downstream* pode levar à interrupção da via de sinalização BRAF/MEK/ERK. Em comparação com inibidores de BRAF e MEK de agente único, uma combinação de inibição de BRAF e MEK mostrou uma menor incidência de hiperproliferação da pele e um surgimento tardio de resistência; o que levou a uma sobrevida livre de progressão (FPS) melhorada. Outra combinação atualmente aprovada usa um EGFR anticorpo junto com um inibidor de BRAF, com o objetivo de superar a sinalização de *feedback* adaptativo mediada por EGFR que leva à reativação da via MAPK após a monoterapia direcionada a BRAF (Gouda & Subbiah, 2023).

Mais recentemente, os tratamentos imunoterápicos com anticorpos anti-CTLA-4 e anti-PD1, conhecidos, respectivamente, como Ipilimumab e Nivolumab, vêm sendo utilizados na clínica com bons resultados. Sua atuação baseia-se no bloqueio da regulação negativa das células T citotóxicas induzida pelas células tumorais a fim de burlar o sistema imune, ao subverter um mecanismo de proteção do organismo contra doenças autoimunes. Dessa forma, tais anticorpos bloqueiam os receptores de regulação negativa das células T citotóxicas, mantendo-as ativas por mais tempo (Wagstaff et al., 2022). Essa abordagem terapêutica, resultou em uma progressão livre de doença de 11,5 meses e uma sobrevida global maior que 37 meses para tratamento combinando de Ipilimumab e Nivolumab (Wolchok et al., 2017), enquanto o tratamento de Dabrafenib + Trametinib resulta em progressão livre de doença de 11,4 meses e uma sobrevida geral de 25,1 meses (Long et al., 2015).

2. RNAs longos não codificantes – lncRNA

O tratamento do melanoma avançou muito nos últimos anos com desenvolvimento de uma nova classe de moduladores imunológicos, incluindo inibidores de checkpoint direcionados a CTLA-4 e PD-1, além dos clássicos inibidores das quinases BRAF^{V600E} e MEK. No entanto, a resistência aos tratamentos e a recidiva do câncer é a realidade de grande parte dos pacientes com melanoma. Tendo isso em vista, há uma necessidade urgente de identificar novos alvos moleculares e abordagens terapêuticas para tratamentos mais eficazes e duradouros para pacientes com melanoma.

Nos últimos anos a busca por marcadores moleculares que promovem e sustentam a processo tumoral trouxeram grande destaque à classe dos RNA não codificantes (ncRNA), que até pouco tempo atrás eram considerados uma parte irrelevante do genoma (Diamantopoulos et al., 2018). Dentro dessa classe, existe um grupo de moléculas que ganharam muito destaque no estudo da biologia de várias doenças. Os RNAs longos não codificantes (*Long non Coding RNA* – lncRNA) possuem características muito interessantes para um biomarcador, como um padrão de expressão específico de tipo celular em estados normais e patológicos, ainda mais do que os genes codificadores de proteínas (Sarropoulos et al., 2019), e recentemente, dezenas de estudos demonstrarem que o ganho e a perda de função de lncRNAs selecionados podem influenciar processos celulares, desenvolvimento e doenças (Rinn & Chang, 2020).

A classe dos ncRNAs são divididos principalmente em duas categorias com base em seu comprimento, sendo a primeira composta por RNA com menos de 200 nucleotídeos (nt) de comprimento chamados de sncRNAs (*Small Untranslated RNA*), e incluem rRNA (RNA ribossômico), tRNA (RNA transportador) miRNA (microRNA), siRNA (RNA de interferência), piRNA (RNA de interação com Piwi), snoRNA (RNA pequeno nucleolar), snRNA (RNA pequeno nuclear) e tRFs (fragmentos derivados de tRNA). A segunda categoria são os ncRNA mais de 200 nt, os lncRNA (C. Lin & Yang, 2018).

A característica mais interessante dos lncRNA no contexto de doenças é o padrão de expressão que essas moléculas possuem. A expressão de muitos lncRNAs é altamente específica do tecido e muitos são detectados apenas sob certas condições de estresse (C. Lin & Yang, 2018). A expressão de um número considerável de lncRNAs é regulada e alguns têm papéis em diferentes mecanismos de regulação gênica. Vários lncRNAs controlam a expressão de genes próximos afetando sua transcrição e afetam outras facetas

da biologia da cromatina, como a replicação do DNA ou a resposta ao dano e reparo do DNA. Outros lncRNAs funcionam longe de seus *loci*; suas funções podem ser de natureza estrutural e/ou regulatória e envolvem diferentes estágios da vida do mRNA, incluindo splicing, turnover e tradução, bem como vias de sinalização (Statello et al., 2020).

Os lncRNAs compreendem um grupo diversificado de RNAs, classificados por sua posição relativa aos genes codificadores de proteínas. Assim, cinco grupos são descritos: lncRNAs sense, antisense, bidirecionais, intrônicos e intergênicos (de Oliveira et al., 2019). Em geral, os lncRNAs compartilham características comuns com os mRNAs: ambos são transcritos pela RNA polimerase II, podem ser poliadenilados e *capping* 5'. A maioria dos lncRNAs é estabilizada por meio de poliadenilação (Clark et al., 2012), enquanto os lncRNAs não poliadenilados podem ser estabilizados por meio de estruturas secundárias, como estruturas de hélice tripla em suas extremidades 3' (Wilusz et al., 2012). Os loci que expressam lncRNAs são semelhante aos de genes codificadores de proteínas, incluindo marcas de histonas de promotores ativos H3K4me2/3, H2K9ac, H3K27ac) e corpos gênicos transcritos ativamente (H3K36me3) (C. Lin & Yang, 2018), múltiplos éxons, *splicing* alternativo, regulação por morfogênicos e fatores de transcrição convencionais, expressão alterada em câncer e outras doenças, e uma gama de meias-vidas semelhantes às dos mRNAs (Mattick et al., 2023).

Os lncRNAs geralmente não possuem ou têm muito poucos quadros de leitura aberta (ORFs), e os transcritos de lncRNA são mais curtos e têm menos éxons (Diamantopoulos et al., 2018). Os lncRNAs podem ser “intergênicos” (localizados entre dois genes), antisense ou intrônicos. Eles também são derivados de 'pseudogenes', que ocorrem comumente em genomas de metazoários, sendo que no genoma humano já foram identificados quase 15.000, alguns dos quais demonstraram ser funcionais (Frankish et al., 2021). Os lncRNAs também incluem RNAs circulares gerados por *back-splicing* de transcritos codificantes e não codificantes, também com funções demonstrada (Patop et al., 2019), e RNAs regulatórios de ação *trans* derivados de sequências que agem convencionalmente como regiões 3' não traduzidas de mRNAs (Mercer et al., 2011).

Os lncRNA possuem localizações subcelulares específicas, o que vai ser muito relacionado com sua função celular. Como os primeiros lncRNA caracterizados funcionalmente eram principalmente reguladores de cromatina, por um tempo acreditava-se que os lncRNA eram predominantemente nucleares (Zuckerman & Ulitsky, 2019). Entretanto, estudos recentes indicam que o número de lncRNA citoplasmáticos é bem maior do que se pensava (Mas-Ponte et al., 2017). Trabalhos recentes demonstraram que,

ao contrário dos mRNA conservados, os lncRNA conservados são processados de maneira diferente entre as espécies, logo possuem localização subcelular diferente, por consequência, função diferente (C. J. Guo et al., 2020).

Embora os lncRNAs nucleares sejam em geral mais abundantes, eles são menos estáveis do que os citoplasmáticos. Isso sugere que a instabilidade dos lncRNAs nucleares reflete seu papel na regulação da expressão gênica, facilitando o ajuste dinâmico de seus níveis em resposta a estímulos, análogo ao turnover de fatores de transcrição (Rinn & Chang, 2020). No núcleo, os lncRNAs funcionam para modular os programas de transcrição por meio de interações e remodelamento da cromatina Xist (W. Wang et al., 2021) e/ou estabelecem a organização espacial do compartimento nuclear por meio de andaimes, como NEAT1 (Taiana et al., 2020). No citoplasma, os lncRNAs funcionam para mediar vias de transdução de sinal, programas de tradução e controle pós-transcricional da expressão gênica. Por exemplo, lncRNAs podem sequestrar miRNAs e proteínas para regular sua atividade e níveis, influenciar modificações pós-traducionais de proteínas ou mediam a tradução e a estabilidade do mRNA (Mattick et al., 2023).

Uma análise recente dos perfis de transcrição de amostras de melanoma do banco de dados TCGA relatou 246 lncRNAs diferencialmente expressos em melanoma. Desse total, 184 lncRNAs foram regulados positivamente no melanoma metastático, enquanto as expressões de outros foram diminuídas (Melixetian et al., 2022). A análise de sobrevivência revelou associação entre a desregulação de vários desses transcritos e a diminuição da sobrevivência geral de pacientes com melanoma. Consequentemente, lncRNAs têm sido relatados como agentes potenciais na progressão do melanoma e marcadores biológicos neste câncer (L. Sun et al., 2019). lncRNAs que são altamente expressos em melanoma, podem ser considerados promotores de tumor (oncogene), particularmente aqueles com efeitos de aumento de tumor na proliferação celular, metástase e invasão verificados em estudos *in vivo*. Por outro lado, os lncRNAs pouco expressos em tecidos malignos podem ser citados como lncRNAs supressores de tumor, e promovem o bloqueio a proliferação celular, migração, invasão e metástase em circunstâncias normais (Dashti et al., 2023).

3.1 lncRNA *Restricted to Melanoma 3* – RMEL3

Foi em busca de novos biomarcadores de diagnóstico e tratamento no melanoma, que nosso grupo de pesquisa, no início dos anos 2000, identificou genes enriquecidos em melanoma. Para isso, foi desenvolvida uma ferramenta de bioinformática chamada *EST2TSE* (*EST to Tissue Specific Expression*) que identificou 29 clusters de EST

(*Expressed Sequence Tags*) do Unigene originados exclusivamente de melanoma (Sousa et al., 2010). Dentre os clusters identificados, foram escolhidos alguns genes putativos para validação experimental, entre eles RMEL3 (*Restricted to Melanoma 3*), o qual confirmou sua expressão enriquecida em um painel de células de melanoma e tecidos.

Análises *in silico* com o RMEL3 demonstraram sua conservação em primatas e localização na região 5q11.2, sendo formado por múltiplos éxons, além de apresentar ORFs (Open Reading Frames) pequenas e baixo potencial codificante (Sousa et al., 2010). O fato do RMEL3 possuir expressão tecido específica e não ser conservado em outros grupos além dos primatas reforçou a hipótese de que o nosso grupo havia identificado um potencial lncRNA.

Atualmente, sabemos que o RMEL3 tem sua expressão enriquecida em melanomas quando comparado com o melanócito, tecidos saudáveis e outros tecidos tumorais (Goedert et al., 2016). Para essa análise, foram utilizadas um grande conjunto de amostras do TCGA, e foi observado que a expressão de RMEL3 é significativamente aumentada em melanomas e em linhagens de melanoma com a mutação c.1799T>A no gene BRAF (BRAF^{V600E}), a mutação com maior incidência no melanoma (Cardoso et al., 2019; Goedert et al., 2016). A associação de RMEL3 com BRAF^{V600E}, portanto com a via de MAPK/ERK, foi demonstrada através do tratamento de células de melanoma BRAFV600E com inibidor de BRAF^{V600E} (PLX4032), que resultou na redução significativa da expressão de RMEL3 após tratamento (Cardoso et al., 2019). Coerentemente, a região promotora de RMEL3 apresenta sítios de ligação para fatores de transcrição ativados por ERK como FOS, JUN, MYC, STATs, GATA, TAL1, TEAD4, NR2F2, e CTCF, o que condiz com sua potencial ativação por BRAF^{V600E} (Cardoso et al., 2019).

A participação do RMEL3 na regulação das vias de MAPK/ERK e PI3K em melanoma foi observada através de uma abordagem integrada de bioinformática e dados de expressão gênica por microarranjo e RPPA (*Reverse-phase Protein Array*), onde foi demonstrado que o RMEL3 regula diversos genes das vias de MAPK e PI3K-Akt no nível transcriptômico e proteico (Goedert et al., 2016). Ainda utilizando os dados de melanoma do TCGA, nosso grupo identificou a correlação de RMEL3 com as principais alterações genéticas que levam ao desenvolvimento do melanoma, tais como a deleção do locus CDKN2A/B, além da correlação com a mutação BRAF^{V600E}. Foi observado que a expressão de RMEL3 é elevada em tumores subcutâneos e fenotipicamente invasivos (Goedert, 2019).

Outra importante associação observada pelo grupo foi que o locus RMEL3 possui uma frequência relativamente alta de mutações, sendo a maioria da assinatura de mutações causadas por exposição à luz ultravioleta. A presença de mutações está associada a pior prognóstico e a expressão do RMEL3 é maior em melanomas extensivos superficiais e nodulares, que são os mais frequentes e têm a exposição à luz UV como principal fator de risco (Cardoso et al., 2019). A superexpressão de RMEL3 reduz a apoptose e impede a parada no ciclo celular induzidas por privação de mitógenos e fatores de crescimento, além de induzir um maior crescimento clonogênico e maior crescimento tumoral *in vivo* (Cardoso et al., 2019). Também foi observado que RMEL3 é capaz de proteger células não tumorais de fibroblastos NIH-3T3 da parada de proliferação e morte celular causadas por privação de soro fetal bovino, no meio de cultura, uma situação que mimetiza também a privação de nutrientes (Cardoso et al., 2019).

No último ano, o nome RMEL3 cunhado por Souza e colaboradores (2010) foi aprovado no *HUGO Gene Nomenclature Committee* (HGNC) ([HGNC:HGNC:53975](#), [ENSG00000250961](#); [Chr5: 57,395,060-57,534,504](#)). Até o ano de 2021, quando buscávamos pelos transcritos do locus de RMEL3 nos bancos de dados disponíveis, encontrávamos no ENSEMBL descrito somente a forma canônica RMEL3_201 ([ENST00000506106.1](#)) de 897 nt, e que foi avaliada em nossos trabalhos anteriores. Em uma atualização recente do ENSEMBL (Martin et al., 2023), foi adicionado um transcrito maior (2168 nt) e com um novo éxon inicial (RMEL3_202 – [ENST00000664944.1](#)). No banco especializado em ncRNAs NONCODE (REF), para o gene de RMEL3 ([NONHSAG040444.2](#)) estão anotados os transcritos RMEL3_201 ([NONHSAT101576.2](#)) e o RMEL3_202 ([NONHSAT259691.1](#)), e também outras dois outros: [NONHSAT202616.1](#) (1419 nt) e [NONHSAT101579.2](#) (394 nt). No banco de dados NCBI, outro transcrito, [LOC102724122](#), com 3689 nt, foi gerado por anotação exclusivamente automática, a partir da sequência genômica. No banco de dados LNCipedia (Volders et. al, 2019), para o gene RMEL3 ([lnc-GPBP1-1](#)) reporta o [lnc-GPBP1-1:1](#) (RMEL3_201) e [lnc-GPBP1-1:2](#) (NONHSAT101579.2) de 394 nt. Além dessas isoformas, o banco de dados circBASE (Maass et. al, 2017) descreve uma isoforma circular do RMEL3 ([hsa_circ_0142225](#)) com 289 nt. (Figura 5).

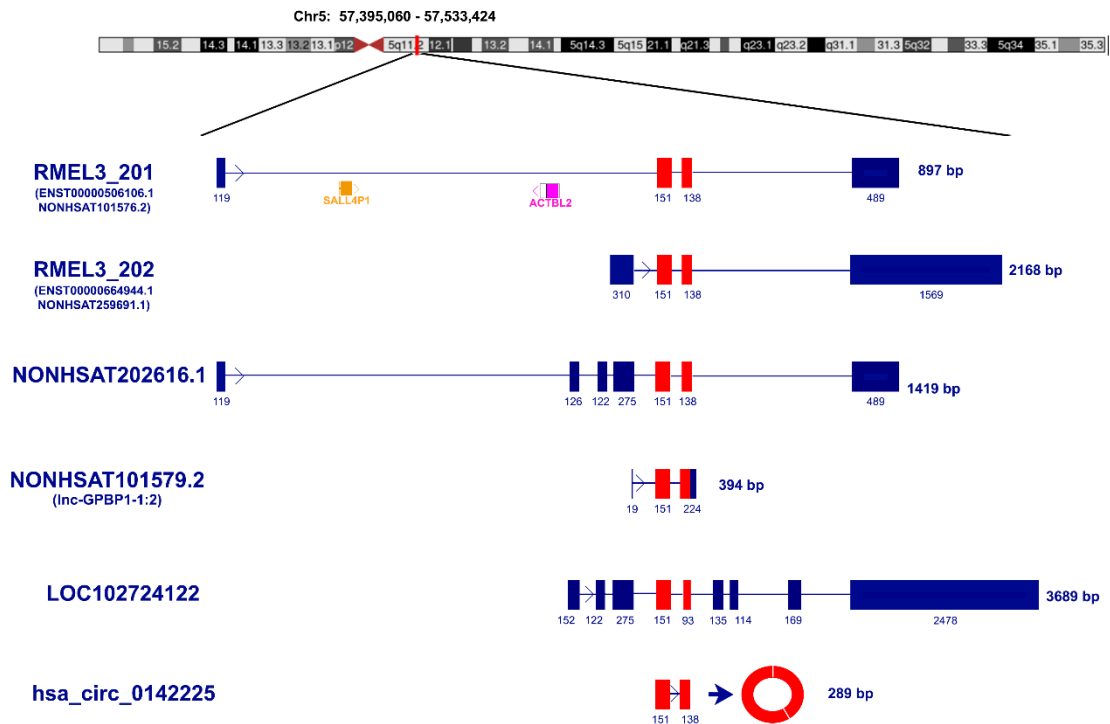


Figura 4 - Organização éxon-íntron dos transcritos anotados no locus RMEL3 mapeado no cromossomo 5, q11.2. Ilustração do locus do gene RMEL3 e a organização éxon-íntron dos transcritos anotados, RMEL3_201 e RMEL3_202 [éxons (retângulos) e íntrons (linhas)]. Em vermelho estão destacados os éxon que são comuns a todas os transcritos. A cabeça de seta nas linhas do íntron 1 indica a direção de transcrição. Os transcritos oriundos do locus de RMEL3 anotados nos bancos de dados ENSEMBL, NONCODE, LNCipedia, NCBI e circBASE.

No locus de RMEL3 ainda estão mapeados dois outros genes: SALL4P1, na mesma fita do RMEL3 e ACTBL2, na fita oposta. SALL4P1 é classificado como um entre oito pseudogenes do gene codificante do fator de transcrição SALL4 (Spalt Like Transcription Factor 4), o qual está associado à pluripotência e à progressão do melanoma, sendo requerido para expansão inicial do tumor, mas tendo um papel inibitório sobre o fenótipo invasivo na etapa mais avançada (Diener et al., 2021). Já ACTBL2 (β -actin-like-2, κ -actin), inicialmente cogitado ser um pseudogene, foi recentemente definido como um gene expresso, com padrão de expressão tecidual bastante restrito. A proteína tem 376 resíduos de aminoácidos e é altamente conservada ao longo da escala filogenética. O gene não tem íntrons e, portanto, sugerindo que seja oriundo de um evento de retrotransposição. A proteína foi recentemente caracterizada como tendo importância nos processos de migração e invasão em células de melanoma (Malek et al., 2021). Tendo em vista a utilização do RMEL3 como um biomarcador de melanoma e um potencial alvo terapêutico, conhecer mais a fundo sua biologia e seu papel na manutenção da malignidade do melanoma é de extrema importância. Avaliar a expressão dos transcritos, o papel do RMEL3 nos fenótipos tumorais e seus possíveis mecanismos de atuação é alvo de estudo neste trabalho.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente trabalho foi a caracterização estrutural e funcional do lncRNA RMEL3 na linhagem de células de melanoma A375.

2.2 Objetivos Específicos

1. Determinar os transcritos oriundos do locus do RMEL3 e as extremidades 5' e 3' na linhagem de melanoma A375.
2. Avaliar a distribuição subcelular dos transcritos de RMEL3 em células de melanoma.
3. Analisar a consequência funcional do silenciamento RMEL3 sobre as propriedades tumorigênicas das células de melanoma A375.
4. Confirmar a ligação do lncRNA RMEL3 às proteínas das vias de sinalização MAPK e Hippo identificadas previamente pelas técnicas de *pulldown* do RMEL3 endógeno/ e espectrometria de massas.
5. Analisar o papel do RMEL3 na regulação do programa de expressão gênica de resposta ao soro em células A375 através de RNAseq de células silenciadas e controle.

3. Metodologia

3.1 Cultivo Celular

Linhas celulares – Melanoma: A375 (CRL-1619TM – ATCC, Manassas, VA, EUA), SKMEL-28 (HTB-72TM), WM902B (CVCL_6807); não tumorais: HEK-293T (CRL-3216TM – ATCC) e HUVEC (CRL-1730TM). As linhas A375, HEK-293T e HUVEC foram cultivadas em meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium* – Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (SFB – Thermo Fisher Scientific) inativado, e com 100mg/ml penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, EUA). As linhas SKMEL-28 e WM902B foram cultivadas em meio RPMI (*Roswell Park Memorial Institute* – Thermo Fisher Scientific) suplementado com 10% (v/v) de SFB inativado, e com 100mg/ml penicilina/estreptomicina. Todas as células foram mantidas a 37°C em atmosfera úmida contendo 5% de CO₂. As células foram tripsinizadas para experimentos e manutenção com 0,25% tripsina e 0,025% EDTA (Sigma-Aldrich).

3.2 Purificação de RNA, síntese de cDNA e qRT-PCR

O RNA total foi extraído das células usando o reagente TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) de acordo com as especificações do fabricante. Os pellets de RNA foram suspensos em água DEPC e as amostras quantificadas a 260/280 nm em espectrofotômetro (NanoVue - GE Life Sciences, Buckinghamshire, Inglaterra). Para eliminar eventual contaminação com DNA genômico, todo o volume de RNA extraído no passo anterior foi tratado com DNase I (*DNA freeTM - Ambion*) em tampão DNase I 10X num volume reacional de 20 µL, por 30 minutos a 37°C. Após este período foram adicionados 1 µL do reagente inativador e seguido de incubação por 5 minutos à temperatura ambiente. Prosseguiu-se com uma centrifugação a 10000 xg por 1 minuto e 30 segundos. O RNA tratado presente no sobrenadante foi transferido para um tubo novo e quantificado por espectrofotometria.

Para a RT-PCR quantitativa, todas as amostras de RNA (2 µg) foram convertidas em cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA *High Capacity* (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). A reação foi incubada a 25°C por 5 minutos, 42°C

por 120 minutos e a transcriptase reversa foi inativada por aquecimento a 85°C por 5 minutos. Após a reação, os cDNA foram diluídos 10x com água DEPC.

Para qRT-PCR, o reagente GoTaq® RT-PCR Systems (Promega – Madison, WI, EUA) foi usado em reações com um volume final de 10 µl contendo 5 µl de GoTaq Mix 2X, 300 nM de primer senso e 300 nM de primer antisense e 2 µl de cDNA. As reações e análises de amplificação foram efetuadas utilizando o equipamento ABI PRISM 7500 *Sequence Detection System* (Applied Biosystems) utilizando o software ABI 7500 Real-Time PCR SDS 1.2 (Applied Biosystems). A quantificação relativa da expressão de mRNA foi feita usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Os genes GAPDH e TBP foram usados como genes de referência. As sequências dos iniciadores são apresentadas na tabela abaixo (Tabela 1). Os dados da PCR em tempo real foram analisados pelo teste t não pareado, com $P < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

Tabela 1 - Sequências dos primers utilizados para qRT-PCR.

<i>Transcrito</i>	<i>Primer Senso (5'>3')</i>	<i>Primer Antisense (5'>3')</i>
<i>RMEL3 All</i>	GAGGGGAGGATTTTCGTTCCA	TTCCTCTGGTTTTCTTGGAGCA
<i>RMEL3 RT</i>	ATGTGCTCCAAGAAAACCAGAG	CTTTGTACACAGGAATACCCAAC
<i>TBP</i>	CGGCTGTTTAACTTCGCTTC	CACACGCCAAGAAACAGTGA
<i>GAPDH</i>	GTCTCCTCTGACTTCAACAGCG	ACCACCCTGTTGCTGTAGCCAA
<i>TINCR</i>	TGTGGCCCAAACCTCAGGGATACAT	AGATGACAGTGGCTGGAGTTGTCA
<i>SAMMSON</i>	CCTCTAGATGTGTAAGGGTAGT	TTGAGTTGCATAGTTGAGGAA

3.3 Síntese cDNA, RT-PCR e PCR – 3'RACE

Para a determinação da extremidade 3' dos transcritos oriundos do locus de *RMEL3* utilizamos a técnica de RT-3'RACE (*Rapid Amplification of cDNA Ends*) (Green & Sambrook, 2019; Scotto-Lavino et al., 2007). Resumidamente, uma população de RNAs poliadenilados é transcrita em cDNA usando um iniciador adaptador com um poli(T) em sua extremidade 3' e 20-40 nt de sequência conhecida em sua extremidade 5' (primer Qt) (Figura 5). A transcrição reversa foi seguida por duas rodadas sucessivas de reação em cadeia da polimerase (PCR). A primeira PCR é realizada com um primer anti-senso que anela da região 3' conhecida adicionada após o poli(T) do cDNA (primer Q0) e por um primer gene específico senso (primer GSP1) que anela no *RMEL3*. Os produtos da primeira PCR são usados como moldes para uma segunda PCR *nested*, que é iniciada por um primer GSP mais interno que anterior e por um primer que reconhece a região central do adaptador do oligo-dT (Q1). Os primers GSP que foram utilizados para o 3'RACE foram desenhados para anelarem nos éxons iniciais dos transcritos do ENSEMBL (*RMEL3_201* e *RMEL3_202*).

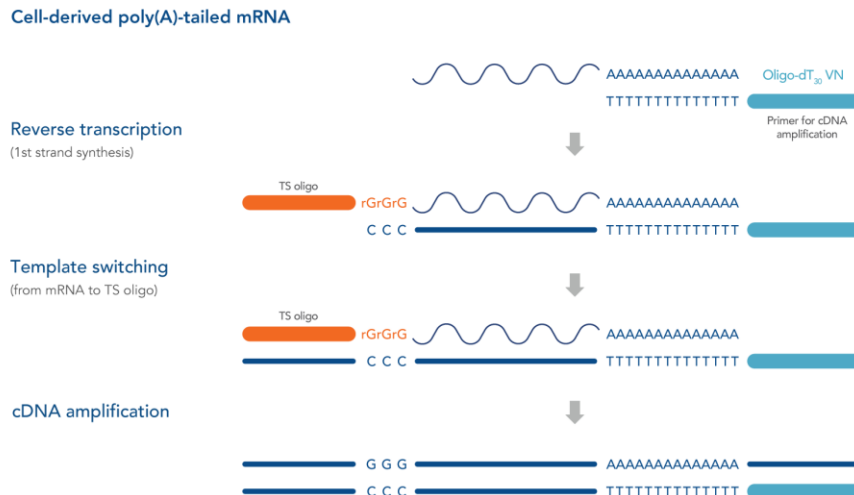


Figura 5 - Representação esquemática da síntese de cDNA para os ensaios de 3'RACE e 5'RACE. Os retângulos azul-claros representam o iniciador oligo-dT-adaptador e os retângulos laranjas representam os oligos Template-switching (TSO). Fonte: Template switching oligos (TS oligos, TSOs) for cDNA library construction | IDT.

Para a síntese do cDNA, foram utilizados RNA obtidos como descrito no item 3.2. Fizemos dois protocolos de síntese: o cDNA 1 foi feito com a metodologia de Green & Sambrook (2019) onde foram utilizados 2 µg de RNA diluídos em 10 µL de água DEPC e incubado por 5 min a 75°C e depois resfriado em gelo por 3 min. Depois foi adicionado ao RNA: 5 µL 10X RT Buffer; 3 µL de dNTP mix (0,6 mM cada); 0,5 µl inibidor RNaseOUT (20 U) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.); 2 µl *MultiScribe Reverse Transcriptase* (100U) (Applied Biosystems); 8 µl do primer Qt (1,6 µM); 21,5 µl de água DEPC. A reação foi incubada por 5 min a 25°C, seguido por 1 hora a 37°C e 10 min a 50°C. A inativação da RT foi por 15 min a 72°C. Os cDNA foram diluídos 1:20 para serem utilizados nas etapas posteriores. O cDNA 2 foi feito de acordo com Scotto-Lavino et al. (2007): 2 µg de RNA foi diluído em água DEPC num volume de 11,5 µl e incubado por 3 min a 80°C, depois incubados em gelo por 3 min. Em seguida, foram adicionados 2 µl de RT Buffer; 1 µL de dNTP mix (1,3 mM cada); 2 µL de DTT (12,9 mM); 0,5 µl inibidor RNaseOUT (20 U); 2 µl *MultiScribe Reverse Transcriptase* (100U); 1 µl do primer Qt (500 nM). A reação foi incubada por 5 min a 25°C, seguida de 1h a 42°C e depois, 10 min a 50°C. O cDNA 2 foi diluído 1:50 em água DEPC.

A primeira amplificação foi realizada com 5 µl do cDNA; 1,5 µM do primer Q1 e 1,5 µM do primer GSP1-RMEL3_201_Fw1 ou GSP1-RMEL3_202_Fw1; e o kit KAPA Taq HotStart PCR (Kapa Biosystems – Massachusetts, EUA) conforme as instruções do fabricante. Os ciclos da primeira PCR foram diferentes do convencional: a reação foi incubada por 5 min a 95°C, 2 min a 55-58°C (dependendo do primer), e a primeira

extensão foi por 40 min a 72°C. Em seguida, foram feitos 30 ciclos (10s a 94°C – 10s a 55-58°C – 3min a 72°C) e por fim uma extensão adicional de 15 min a 72°C. Os produtos de PCR derivados foram diluídos 1:10 em água DEPC e usados como modelos para um 3'RACE *nested* para aumentar ainda mais o rendimento, bem como a especificidade. Para isso, usamos primer para o adaptador do final d(T) (Q1) junto com um GSP mais interno que o primeiro (GSP2-RMEL3_201_Fw2 ou GSP2-RMEL3_202_Fw2). Foi feita a eletroforese em gel de agarose (1%) em TAE IX. As bandas detectadas foram extraídas do gel de agarose e purificadas com o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* conforme instruções do fabricante.

Utilizando os mesmos cDNAs gerados para o 3'RACE, foi realizada PCR convencionais a fim de tentar obter os transcritos endógenos RMEL3_201 e RMEL3_202. Utilizando as sequências disponíveis no ENSEMBL, desenhamos primer para anelarem nas extremidades 5' e 3', no caso do RMEL3_201, ou mais próximo a extremidade 3' no caso do RMEL3_202. Na PCR foram utilizados 5 µl do cDNA; 1,5 µM de cada primer GSP (Tabela 2); 12,5 µl de GoTaq® Green Master Mix (Promega). O ciclo da PCR foi: 2 min 95°C seguido de 30 ciclos de 30s a 95°C – 30s a 55°C – 3 min a 72°C, seguido por extensão final de 15 min. Foi feita a eletroforese em gel de agarose (1%) em TAE 1X (40 mM Tris, 20 mM acetic acid e 0,4 mM EDTA, pH 8,0). As bandas detectadas foram extraídas do gel de agarose e purificadas com o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen – Hilden, Alemanha) conforme instruções do fabricante.

Tabela 2 - Primers utilizados na síntese do cDNA e nas ampliações do 3'RACE.

<i>Nome</i>	<i>Sequência</i>
<i>Qt</i>	5' – GACTCGAGTCGACATCGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT– 3'
<i>Q1</i>	5' – GACTCGAGTCGACATCG–3'
<i>GSP1-RMEL3_201_Fw</i>	5' – AAGCTTTTACTCTCCCAGACTTGTTCTCA–3'
<i>GSP2 RMEL3_201_Fw</i>	5' – TTACTCTCCCAGACTTGTTTC–3'
<i>GSP-RMEL3_201_Rv</i>	5' – GAATGAGGTTGGGATAAGCC–3'
<i>GSP1-RMEL3_202_Fw</i>	5' –TTACTCTCCCAGACTTGTTTC–3'
<i>GSP2-RMEL3_202_Fw</i>	5' –GGATATGACTCAGTAGAATGCTGAT–3'
<i>GSP-RMEL3_202_Rv</i>	5' – GGGTGCATTGTAGAGTCAGCA–3'

3.4 Síntese do cDNA *Template-switching* e PCR – 5'RACE

Para determinação da extremidade 5' foi utilizado a metodologia *Template-switching* 5'RACE baseada em Adamopoulos et al., 2022. Para gerar a biblioteca de cDNA completos compatíveis com as reações posteriores de 5'RACE, a transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando um oligo-dT-adaptador como primer RT e uma enzima transcriptase reversa que possui uma nucleotidil transferase terminal associada (TdT), que promove a adição de ribocitosinas (dC) na extremidade 3', que permite a adição de nucleotídeos não modelados a essa extremidade do cDNA. Com base nisso, os oligos *template-switching* (TSO) (Tabela 3) foram projetados para anelamento nos nucleotídeos extras adicionados, explorando o mecanismo de troca de modelo dependente de cap 5'. Foi utilizado um TSO quimérico DNA/RNA constituído por uma sequência oligo de DNA com 3 riboguanosinas [r(GGG)] em sua extremidade 3' vai anelar com a 3' dC do cDNA e gerar um cDNAs com uma sequência universal na extremidade 5'. Para os passos seguintes, foram utilizados primer senso universal desenhados para anelar na sequência do TSO.

Para a síntese da primeira cadeia de cDNAs completos, foram utilizados RNA das células A375 (item 3.2). A primeira etapa foi a desnaturação do RNA e emparelhamento do iniciador oligo-dT, para isso foi misturado 2 µg de RNA, 1 µl de oligo-dT-adaptador (1µM) e água DEPC (volume final: 4,5 µl), e depois a reação foi incubada por 3 min a 72°C, seguido por 2 min a 42°C. O próximo passo foi ajustar o volume final da mistura de síntese de cDNA para 10 µl, adicionando os seguintes reagentes: 1,25 µl água DEPC; 2 µl de 5X *First-Strand Buffer* (Takara Bio, Inc – Shiga, Japão); 0,25 µl DTT (100 mM), 1 µl dNTP mix (10 mM cada); 0,25 µl inibidor RNaseOUT (10 U) (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Inc.); 0,75 µl (75 U) SMARTScribe™ Reverse Transcriptase (Takara Bio, Inc). A reação foi incubada a 42° por 70 min para permitir a síntese do cDNA. Neste ponto, 1 µl TSO (10 µM) e 0,25 µl (25 U) SMARTScribe™ Reverse Transcriptase foram adicionados à mistura de reação, sem remover os tubos de reação do termociclador (Fig. 5). A mistura de reação foi então incubada a 42°C por mais 20 min, e por fim a inativação térmica da enzima RT foi alcançada incubando a mistura RT a 72 °C por 10 min. Os cDNAs foram diluídos 1:5 e foi usado como modelo para as reações 5' RACE a jusante.

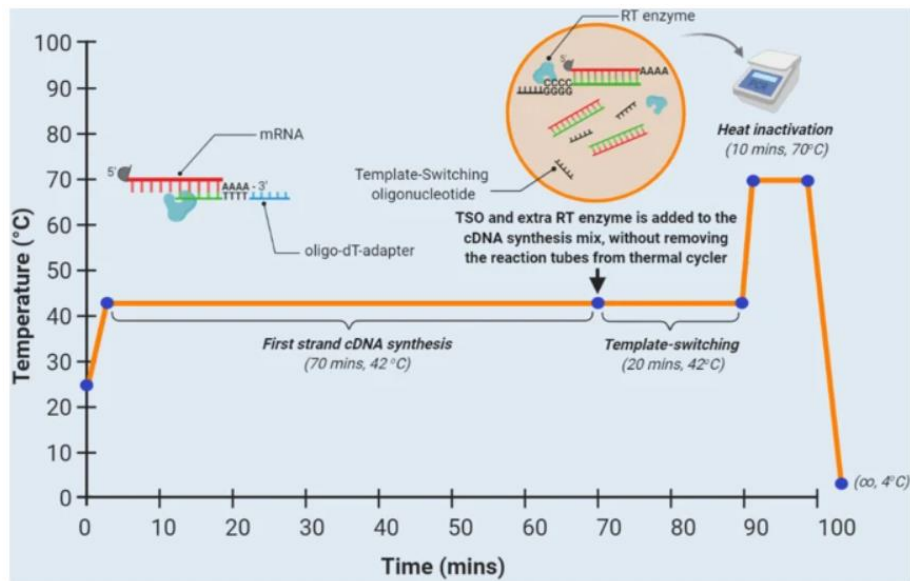


Figura 6 - Demonstração esquemática do protocolo de RT de 2 etapas. (Adamopoulos et al., 2022)

A amplificação das extremidades 5' do cDNA foi realizada para RMEL3 usando um primer direto universal (5RACE_Fw1) projetado para anelar na sequência TSO e um primer específico de RMEL3 anti-senso (RMEL3_201-Ex4). Os primers foram desenhados com base na sequência dos transcritos RMEL3_201 e RMEL3_202, então os GSP anelam nos éxons 4 e 3, que são comuns nas duas isoformas (Figura 4). Para a primeira PCR, foi utilizado 2 µL de cDNA; 1 µL de 5RACE_Fw1 (1 µM) e 1 µL de RMEL3-Ex4_Rv1 e o kit KAPA Taq HotStart PCR (Kapa Biosystems – Massachusetts, EUA) conforme as instruções do fabricante. Os produtos de PCR foram corridos em gel de agarose 1% em TAE 1X e seis diferentes regiões do gel foram cortadas e extraído o DNA para serem utilizados usados como modelos para um 5' RACE *nested* para aumentar ainda mais o rendimento, bem como a especificidade e a sensibilidade para 5' UTRs. Para conseguir isso, usamos um segundo iniciador direto universal (5RACE_Fw2) junto com um GSP mais interno que o primeiro (RMEL3-Ex3_Rv2). Foi feita a eletroforese em gel de agarose (1%) em TAE 1X. As bandas detectadas foram extraídas do gel de agarose e purificadas com o kit *QIAquick® Gel Extraction Kit* (Qiagen) conforme instruções do fabricante.

Tabela 3 - Primers utilizados na síntese do cDNA *Template-Switching* e nas amplificações do 5'RACE.

Nome	Sequência
TSO	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCr (GGG) -3'

<i>5RACE_Fw1</i>	5' -AAGCAGTGGTATCAACGCAGAG-3'
<i>5RACE_Fw2</i>	5' -CAGTGGTATCAACGCAGAGTAC -3'
<i>RMEL3-Ex4_Rv1</i>	5' -CTTTGTACAGGAATACCCAAC-3'
<i>RMEL3-Ex3_Rv2</i>	5' -TTCCTCTGGTTTTCTTGGAGCA-3'

3.5 Clonagem dos fragmentos RACE no plasmídeo de sequenciamento pGEM

Os fragmentos obtidos após a segunda PCR 3'RACE e 5'RACE e na RT-PCR foram clonados no vetor de sequenciamento pGEM-T_Easy (Promega) conforme instruções do fabricante. O vetor ligado foi utilizado para transformar células competentes *E. coli* DH5a (Thermo Fisher Scientific) e as bactérias transformadas foram selecionadas por crescimento durante a noite em placas de LB ágar contendo Ampicilina. Após o crescimento das colônias, o DNA plasmidial foi extraído com o *GeneJET Plasmid Miniprep Kit* (Thermo Fisher Scientific). Para a verificar se os insertos tinham sido clonados nos vetores, foi realizada a digestão de 0,5 µg de cada plasmídeo com 5U da enzima de restrição EcoRI (Thermo Scientific). O plasmídeo pGEM-T-Easy possui sítios de EcoRI flanqueando a região de clonagem, o que permite que a digestão com uma única enzima retire o fragmento inserido, ou caso não tenha dado certo, linearize o vetor. Os plasmídeos que continham os insertos foram sequenciados utilizando o primer senso M13, que anela na região *pUC/M13 Forward Sequencing Primer binding site* do vetor pGEM-T-Easy, utilizando o sistema Sequenciador de DNA 3500 Genetic Analyzer (Thermo Fisher Scientific), no Laboratório Multiusuário de Sequenciamento de Ácidos Nucleicos (LMSeq) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.

3.6 Hibridização in situ por fluorescência de RNA (RNA-FISH)

Para a detecção de RMEL3 no nível intracelular, foi utilizado um conjunto de cinco sondas de DNA marcadas com 5' - Cy5 (Tabela 3) disponíveis em nosso laboratório. As células foram plaqueadas em lâminulas redondas de 13 mm em placas de 24 poços, em meio apropriado. Depois de 18 a 24 horas, as células foram lavadas com PBS e fixadas com 2% de paraformaldeído (Sigma-Aldrich) (m/v) em PBS pH 7,4, por 10 minutos. As células foram permeabilizadas com 70% de etanol (Sigma-Aldrich) (m/v) em PBS pH 7,4 durante 1h a 4°C. Após a permeabilização, as células foram lavadas três vezes com tampão de lavagem FISH (2X SSC – Citrato de Sódio Salino, 10% formamida, 10% de

sulfato de dextrano). As sondas (250 nM de cada) foram diluídas em tampão de hibridização (2X SSC, 10% formamida, 10% de sulfato de dextrano, 0,2% de albumina sérica bovina – BSA, 20µg/mL de DNA de esperma de salmão), e as células foram incubadas com essa solução durante a noite em câmara úmida a 37°C. Após a hibridização, as lamínulas foram lavadas três vezes, com incubações de 5 min, 30 min e 30 min com o tampão de lavagem FISH. As células foram incubadas com DAPI (0,1 µg/mL) por 10 min, lavadas três vezes com PBS e montadas em lâminas utilizando *Fluoromount-G, Slide Mounting Medium* (Electron Microscopy Sciences – Hatfield, PA, EUA). Para aquisição de imagens de microscopia confocal a laser utilizamos os sistemas Leica SP5 (Leica, Wetzlar, Alemanha) e AXIOBSERVER LSM 7MP (Carl Zeiss Microimaging, Oberkochen, Alemanha).

Tabela 4 - Sondas utilizadas para RNA-hibridização *in situ* de RMEL3.

<i>Região de hibridização</i>	<i>Sequência da sonda</i>
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -GAGAACAAGTCTGGGAGAGT-3'
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -CTTCATTTGTCCCCAGAAAG-3'
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -GGATCGGCTGTTCTCAAAT-3'
<i>Éxon 2 RMEL_202</i>	5' -ACATAAGATTCTGCAGTGCC-3'
<i>Éxon 2 RMEL_202</i>	5' -CTGATGGAACGAAATCCTCC-3'

3.7 Produção de partículas lentivirais e transdução da A375

Para a produção de lentivírus de 3 geração, as HEK-293T foram plaqueadas em placas de 6 poços, e transfectadas com Polietilenimina (PEI – Sigma-Aldrich) em meio Opti-MEM (Thermo Fisher Scientific), com os plasmídeos empacotadores pHCMVg (525 ng – 75497TM – ATCC), pDMLg/pRRE (375 ng – #12251 – Addgene, Watertown, MA, USA) e pRSV-Ver (600 ng – #12253 – Addgene), e 1,5 µg do plasmídeo de interesse (FH1T-shRNA induzível com doxiciclina contendo os shRMEL3 ou shLacZ – Tabela 5. Ou o plasmídeo de expressão de RMEL3_201 – pLENTI-RMEL3). Depois de 16 horas, o meio da transfecção foi trocado para DMEM suplementado com 30% de SFB. Após 48 e 72 horas de transfecção, o sobrenadante viral foi coletado, filtrado por uma membrana de 0,22 µm e adicionado às células de interesse para transdução viral. A linhagem de melanoma foi transduzida com os lentivírus contendo os shRNA e com pLENTI-RMEL3.

As células HEK293 T foram transduzidas com lentivírus com pLENTI-RMEL3. Depois de 48 horas, o meio de cultura das células transduzidas foi trocado para o meio de cultivo normal (DMEM 10% SFB), contendo 1 µg/ml de puromicina (Sigma-Aldrich) ou 800 µg/ml de G148 (Invivogen) por 7 dias para a seleção das células transduzidas.

Tabela 5 - Sequências dos shRNAs utilizados para o silenciamento do gene da RMEL3.

<i>Nome</i>	<i>Sequência</i>
<i>shRMEL3 #3</i>	GCTGATTGAATTGGCTTCTCA
<i>shRMEL3 #4</i>	GGAATGGCTATCATTGATGA

3.8 Ensaio Clonogênico

As células A375 shRMELs (500 células) foram plaqueadas em placas de 6 poços e mantidas por 10 dias em estufa celular sob 95% de ar e 5% de CO₂ a 37°C. O meio de cultura era suplementado com 0,5 µg/mL doxíciclina a cada 48h. Após esse período, as células foram fixadas com paraformaldeído a 4% (p/v) (Sigma-Aldrich) em PBS (pH 7,4) e coradas com cristal violeta a 2% (p/v) (Sigma-Aldrich) em etanol 0,2% (v/v) para visualização das colônias. As placas foram fotografadas e o número de colônias determinado pelo software ImageJ(Schindelin et al., 2012).

3.9 Ensaio de proliferação

5x10³ células foram plaqueadas em placas de 96 poços, e as análises foram realizadas nos tempos de 0h, 24h, 48h, 72h, 96h e 120h. O meio de cultura era suplementado com 0,5 µg/mL doxíciclina a cada 48h. Para o ensaio o meio foi retirado e os poços foram lavados com 200 µL PBS 1X, seguindo-se fixação das células com 100 µL etanol 70% (Labsynth, Diadema, SP, Brasil) por 10 minutos, e posteriormente adição de 40 µL de 0,5% cristal violeta (Labsynth) por 30 minutos. Após esse período, os poços foram lavados por cinco vezes com 200 µL de água ultrapura autoclavada e foi adicionado 100 µL de ácido acético 10% (Sigma-Aldrich) para solubilizar a coloração das células. As células ficaram incubadas por 30 minutos e a absorbância (540nm) foi analisada utilizando o leitor de ELISA (PowerWave, microplate scanning spectrophotometer-Biotech Incorporation).

3.10 Ensaio de migração com inserto *transwell*

Para o ensaio de migração das células pelos poros do inserto *transwell*, as células A375 shRMEL e shLacZ foram cultivadas em DMEM sem a presença do SFB e na presença de 0,5 µg/mL doxicilina por 72h antes do experimento. No dia do experimento, as células A375 shRMEL3 e sh LacZ na densidade de 1×10^5 células foram ressuspensas em 100 µL de DMEM não suplementado e semeadas nos insertos Transwell® de 8 µm (Corning Incorporated, Nova York, EUA) previamente colocados em placa de cultura celular de 24 poços. Na parte inferior, correspondente aos poços, foi adicionado 500 µL de DMEM 10% SFB. As células foram incubadas a 37°C e 5% CO₂ por 20h. Após a incubação, as células que não migraram, correspondentes às que ficaram na superfície superior ao filtro, foram removidas com cotonetes umedecidos com meio de cultura. As células que migraram através dos poros para o lado inferior do filtro foram fixadas com paraformaldeído a 4% por 15 min em temperatura ambiente, coradas com cristal violeta 0,2% por 10 min e lavadas em cinco banhos de H₂O destilada para remover o excesso de corante. Após a secagem dos insertos, dez campos por grupo foram fotografados, na magnificação de 20X, e contados.

3.11 Ensaio de invasão celular em matriz extracelular

Assim como no experimento de migração celular (Item 3.10), as células A375 shRMEL3 e sh LacZ foram previamente privadas de nutrientes do SFB e induzidas com doxicilina. Os insertos Transwell® de 8 µm foram revestidos com uma fina camada (100 µL) de matriz Geltrex (Thermo Fisher Scientific) diluída 1:4 em PBS gelado e a placa foi deixada por 1h a 37°C para a solidificação da camada de matrigel. As células A375 shRMEL3 e sh LacZ na densidade de 1×10^5 células foram ressuspensas em 100 µL de DMEM simples e foram plaqueadas no inserto coberto com matrigel. Na parte inferior, correspondente aos poços, foi adicionado 500 µL de meio DMEM 10% de SFB. As placas foram incubadas a 37°C por 20h. O processo de coloração das células que invadiram a matriz e atravessaram os poros da membrana foi feita como descrito no item 3.10.

3.12 Análise do ciclo celular por coloração do DNA com iodeto de propídio

Para a análise do ciclo celular, a porcentagem de células em cada fase do ciclo foi detectada pela coloração com iodeto de propídio (PI). As células foram mantidas por 48 h após a indução com 0,5 µg/mL de doxiciclina em placas de 24 poços, depois tripsinizadas, lavadas duas vezes em PBS e fixadas em etanol durante a noite. Após a fixação, as células foram lavadas com PBS e ressuspendidas em solução de iodeto de propídio (0,1% de Triton X-100, 10 µg/mL de PI e 100 µg/mL de RNase livre de DNase) diluído em PBS, por 10 min a 37°C. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas, ressuspendidas em PBS. Em seguida, as células foram analisadas no BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences) utilizando o software BD FACSDiva.

3.13 Avaliação da morte celular por marcação de Anexina-V e iodeto de propídio

A análise da morte induzida pelo silenciamento de RMEL3 foi realizada pela marcação das células A375 shRMEL e sh LacZ com Anexina V-FITC e Iodeto de propídio (PI). Este teste permite a identificação e quantificação de subpopulações de células em apoptose inicial, em apoptose tardia, em necrose e as células viáveis. 5×10^5 células foram semeadas em placas de 12 poços e incubadas durante a noite para adesão na placa. No dia seguinte, para o grupo de análise de morte celular na ausência de SFB, o meio de plaqueamento foi retirado, os poços foram lavados três vezes com PBS e depois foi adicionado DMEM simples. As células foram cultivadas nos tempos de 24h, 48h e 72h. Decorrido o tempo determinado, tanto as células aderentes como as flutuantes foram coletadas e lavadas com PBS, depois ressuspendidas em 100 µL de tampão de ligação de anexina V (10 mM HEPES, 140 mM NaCl e 2,5 mM de CaCl₂ – pH 7,4) contendo 2 µL de anexina-V, por 15 min a temperatura ambiente, protegidas da luz. Após este período, 400 µL do tampão de ligação da Anexina V foram adicionados aos tubos que foram mantidos no gelo e 500 µL da solução de PI (PBS e Iodeto de Propídio – para concentração final de 2 µg/mL) foram adicionados posteriormente. As células foram incubadas por mais 5 minutos no gelo, lavadas com PBS e a aquisição dos dados foi feita no BD Accuri™ C6 Plus Flow Cytometer (BD Biosciences) utilizando o software BD FACSDiva.

3.14 Ensaios para detecção de metabólitos

O ensaio Glucose Uptake-Glo™ (Promega cat. # J1341) foi usado para medir a absorção de glicose na cultura de células A375 shRMEL3 e sh LacZ. Para isso, 5×10^3 células foram plaqueadas em placas de 96 poços no dia anterior ao experimento, e o ensaio foi feito seguindo as recomendações do fabricante. Os níveis de lactato foram medidos do meio cultura das A375 shRMEL3 e sh LacZ incubadas por 48h e do conteúdo intracelular das mesmas usando o ensaio Lactate-Glo™ (Promega cat. # J5021). Para isso, 5×10^3 células foram semeadas em placas de 24 poços, o meio foi coletado e a lise ocorreram após 48h de cultivo e o ensaio foi feito conforme recomendações do fabricante.

3.15 Imunodeteção de proteínas – Western Blot

Após 48 h de indução com 0,5 µg/mL de doxíciclina e as condições experimentais desejadas, as células foram lavadas com PBS frio e lisadas em tampão de lise para ensaio de radioimunoprecipitação (RIPA – Tris 20 mM, pH 7,5; NaCl 150 mM; EDTA 1mM; EGTA 1 mM; NP-40 1% (v/v) Na-desoxicolato; 1:100 Coquetel Inibidor de Protease e Fosfatase – Thermo Scientific). O lisado celular foi centrifugado a 14000 r.p.m. por 15 min a 4°C, e os sobrenadantes foram coletados. A concentração de proteínas foi medida pelo ensaio Pierce BCA (Thermo Scientific). Foi adicionado 1x tampão Laemmli (2% SDS; 5% 2-mercaptoetanol; 10% glicerol; 0,002% azul de bromofenol; 62,5 mM Tris-HCl pH 6,8). Quantidades iguais de amostras de proteína total foram analisadas em eletroforese em gel de poliacrilamida SDS e transferidas para membrana de fluoreto de polivinilideno (PVDF – GE Life Sciences) ou nitrocelulose (GE Life Sciences). A membrana foi bloqueada com 5% leite desnatado (Molico, São Paulo, SP, Brasil) por 1 h e, em seguida, incubada com os anticorpos primários apropriados durante a noite a 4°C ou 1h a temperatura ambiente. O anticorpo secundário acoplado à HRP foi adicionado, e as bandas proteicas foram visualizadas por reagentes de quimioluminescência aprimorados (GE Life Sciences). As imagens foram obtidas pela exposição das membranas com ImageQuant LAS 4000 (GE Life Sciences). A densidade óptica média da proteína-alvo foi determinada usando ImageJ. Os anticorpos utilizados encontram-se na Tabela abaixo.

<i>Proteína</i>	<i>Código</i>	<i>Fabricante</i>
<i>Pan AKT</i>	4058	Cell Signaling Technology
<i>ARAF</i>	MA5-32428	Invitrogen™
<i>BCL-2</i>	610539	BD Transduction Laboratories™
<i>Caspase 3</i>	9665	Cell Signaling Technology
<i>Cleaved PARP (Asp214)</i>	5625	Cell Signaling Technology
<i>Cyclin E2</i>	4132	Cell Signaling Technology
<i>ERK1/2</i>	4695	Cell Signaling Technology
<i>GAPDH</i>	sc-32233	Santa Cruz Biotechnology
<i>HRP-coupled IgG mouse</i>	G-21040	Invitrogen™
<i>HRP-coupled IgG rabbit</i>	31450	Invitrogen™
<i>MST2</i>	PA5-82283	Invitrogen™
<i>Phospho Akt (Ser473)</i>	4691	Cell Signaling Technology
<i>Phospho ERK1/2 (Thr202/Thr204)</i>	9101	Cell Signaling Technology
<i>γ-Tubulin</i>	T3320	Sigma-Aldrich

3.16 *Pulldown do RMEL3*

Para validar as proteínas ARAF, MST2/STK3 e FAM83D como ligantes de RMEL3, realizamos técnica de *Pulldown* mas seguido por *western blot* (item 3.15) para a detecção das proteínas estudadas por anticorpos específicos. As proteínas ARAF, MST2/STK3 e FAM83D foram anteriormente identificadas por espectrometria de massas realizada após a purificação dos ligantes de RMEL3 também por *Pulldown* (Goedert, 2019). O ensaio de *Pulldown* foi baseado em Leucci et.al (2016). Resumidamente, 100 µg de *Beads de Streptavidin Sepharose High Performance* (GE Healthcare) foram lavadas por três vezes no tampão de lavagem (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,05% NP-40), e depois foram acoplados 600 mM de quatro sondas complementares a RMEL3 biotiniladas (250 mM de cada – Tabela 7) durante 16h a 4°C. No dia seguinte, 6x10⁷ células foram lisadas em 2 mL no tampão de lise de *Pulldown* (20 mM Tris-HCl, pH 7,5; 200 mM NaCl; 2,5 mM MgCl₂; 0,05% NP-40; 60 U/mL de RNaseOut, 1 mM de DTT e 1:50 *Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail*), depois centrifugadas a 14000 rpm por 15 min. O lisado proteico foram incubados com as sondas acopladas nas beads por 4 horas a 4°C em rotação. O complexo beads/sondas/RNA capturado foi lavado quatro vezes no tampão de lise, e a cada lavagem foi precipitado por centrifugação a 3000xg por 3 min. Ao final das lavagens, as amostras foram divididas em

duas: 10% das amostras foram separadas para extração de RNA em trizol e o restante foi fervida por 15 min a 85°C com 120 µL de tampão Laemmli (2X). A fração contendo as proteínas foi extraída recolhendo o sobrenadante após centrifugação da amostra a 3000xg durante 3 min. Como controle negativo, foram utilizadas 4 sondas contra PCA3, lncRNA não expresso em melanoma (Tabela 7).

<i>Região de hibridização</i>	<i>Sequência da sonda</i>
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -GAGAACAAGTCTGGGAGAGT-3'
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -CTTCATTTGTCCCCAGAAAG-3'
<i>Éxon 1 RMEL3_201</i>	5' -GGATCGGCTGTTCTCAAAT-3'
<i>Éxon 4 RMEL_201</i>	5' -TCATGTGACTGAAACCCTGCAGTGG-3'
<i>PCA3_1</i>	5' -GCACTTGCTATTTCTTCTGT-3'
<i>PCA3_2</i>	5' -CTCTGTTTTTCTGATGCCAG-3'
<i>PCA3_3</i>	5' -GCTGCAGCCACACAAATCTC-3'
<i>PCA3_4</i>	5' -ATGCAGATCTTCCTGGTCTC-3'

3.17 RNA-Imunoprecipitação

O ensaio de imunoprecipitação por RNA (RIP) foi realizado de acordo com Ramanathan et al., (2018). Células HEK-293T expressando RME3_201 (pLENTI-RMEL3) e a controle (pLENTI) e foram transfectadas com 8 µg de pCMV6M-Mst2 (Plasmídeo #84296 – Addgene) para expressão de myc-MST2 ou 8 µg de pHAGE-ARAF (Plasmídeo #116713 – Addgene) para expressão de ARAF. Para o RIP das proteínas endógenas, foi utilizado as células A375, pois a detecção das proteínas ligantes de RMEL3 foi realizada nessa linhagem (Goedert, 2019) . As células foram lavadas e, em seguida, colhidas em 1 mL de solução salina tampão fosfato gelada (PBS). Em seguida, as células foram centrifugadas a 1800 rpm por 5 min. O pellet celular foi lisado em tampão de lise RIP (Tris 50 mM, pH 7,5; NaCl 200 mM; 0,5% Sarkosyl; 0,2% Triton-X 100; 0,1% NP-40; 10% glicerol; 1 mM EDTA; 1:50 Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail – Thermo Scientific; 20 U/mL de RNAsin inibidor de RNase® – Promega). Os lisados foram brevemente sonificados, para eliminar a viscosidade, clarificados por centrifugação a 14000 r.p.m. por 40 min, e quantificados usando o ensaio Pierce BCA (Thermo Scientific). 50 µg de lisado (10%) foram retirados para isolamento das frações de entrada do RNA. 500 µg de cada lisado foram pré-claros com 40 µL de Dynabeads™

Protein A ou Protein G (Thermo Scientific) por 1 h a 4°C. Em seguida, as amostras foram incubadas durante a noite a 4°C com rotação com mAB de camundongo anti-myc (sobrenadante do hibridoma 9E10) e anticorpo de camundongo (camundongo IgG – Invitrogen) e ou com mAB de coelho anti-ARAF (Invitrogen) ou anti-FAM83D e anticorpo de coelho (IgG coelho – Invitrogen). A amostra foi imunoprecipitada com 40 µL de Dynabeads™ Protein A ou Protein G por 4h a 4°C com rotação. Os imunoprecipitados foram lavados sequencialmente por 10 min cada a 4°C com 1 mL de tampão de alta estringência (20 mM Tris, pH 7,5; 120 mM NaCl; 25 mM KCl; 5 mM EDTA; 1% Triton-X100; 1% Na-desoxicolato), 1 mL de tampão alto teor de sal (20 mM Tris, pH 7,5; 1 M NaCl; 5 mM EDTA; 1% Triton-X100; 1% Na-desoxicolato; 0,001% SDS), 1 mL de tampão com baixo teor de sal (Tris 20 mM, pH 7,5; 5 mM EDTA). Após a lavagem final, 200 µL de tampão Proteinase K (Tris 10 mM, pH 7,5; 50 mM NaCl; 5 mM EDTA; 0,5% SDS) contendo 0,5 mg/ml de Proteinase K (Sigma-Aldrich) foram adicionados a cada imunoprecipitação e incubados a 55°C por 50 min em termomisturador a 1350 r.p.m. O RNA imunoprecipitado foi então purificado pela adição de 500 µL do reagente TRIZOL (Invitrogen). Em fases aquosas foram adicionados 10 µg de Glicogênio UltraPuro™ (Invitrogen), 20 µL de NaCl 2 M, 600 µL de etanol (Merck KGA, Darmstadt, Alemanha) e incubados a -80°C durante a noite. O RNA foi então peletizado por centrifugação a 13000 r.p.m. por 1 h, lavado com 1 mL de etanol 75% e seco. O pellet de RNA foi ressuspendido em 10 µL e tratada com DNase I (DNA-free kit, Ambion). O RNA purificado total foi convertido em cDNA usando o kit de transcrição reversa de cDNA de alta capacidade (Applied Biosystems, CA). Um volume igual de cada cDNA foi usado para verificar a expressão de RMEL3 por RT-qPCR com descrição em isolamento de RNA e RT-qPCR.

3.18 Sequenciamento em Hi-seq 2500 Illumina

Para a análise de perfil transcricional, as células A375 sh LacZ e A375 shRMEL3 #4 forma previamente privadas de mitógenos (cultivadas em DMEM simples) por 72h e depois foram incubadas por 4h com 10% SFB. Após o estímulo de 4h, as células foram coletadas e extraído o RNA com o kit TRIzol™ Plus RNA Purification Kit (Invitrogen) conforme instruções do fabricante. 5 µg de RNA extraído foi tratado com DNase I (Thermo Fisher). As bibliotecas de sequenciamento foram preparadas usando o TruSeq Stranded mRNA Kit (Illumina – NY, EUA) a partir de 500 ng de RNA total. Em resumo,

a integridade do RNA (RIN >8) foi verificada no Bioanalyzer (RNA 6000 Nano Kit, Agilent). RNAs poli-A foram capturados usando oligo-d(T) aderido a *beads* magnéticas. Os RNAs poli-A foram então fragmentados, submetidos à síntese de cDNA de fita dupla, ligados com adaptadores *dual-index*, enriquecidos por PCR e purificados para criar a biblioteca final de cDNA. O comprimento da biblioteca (~300 pb) e a ausência de dímeros foram verificados no Bioanalyzer (High Sensitivity DNA Kit, Agilent). Finalmente, as bibliotecas foram quantificadas usando o Qubit dsDNA Assay Kit, High Sensitivity (Thermo Fisher Scientific), agrupadas e a concentração final da biblioteca ajustada para 4 nM. O sequenciamento foi realizado no instrumento NextSeq 550 (Illumina) utilizando 1,8 pM de bibliotecas agrupadas e no NextSeq 500/550 High Output Kit v2.5 (leituras de 2x75 pb). As bibliotecas e o sequenciamento foram realizados no Laboratório de Genética e Biotecnologia/DGE – UFSCar, sob supervisão do Professor Dr. Marcos Chiaratti.

3.19 Análise de enriquecimento funcional de DEGs

A análise Gene Ontology (GO) é frequentemente usada em estudos de enriquecimento funcional. Além disso, os termos GO enriquecidos podem ser categorizados em processo biológico (BP), função molecular (MF) e componente celular (CC). A Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) é um banco de dados projetado para analisar sistematicamente as vias metabólicas e as funções dos produtos gênicos nas células. A Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA) (Subramanian et al., 2005) foi feita no site <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/annotate.jsp> e foram computadas sobreposições dos DEGs regulados negativamente com outros conjuntos de genes no MsigDB (Liberzon et al., 2015). Os mapas de vias KEGG foram plotado por <http://www.bioinformatics.com.cn/srplot>, uma plataforma online para análise e visualização de dados, utilizando o módulo “*GO, pathway Enrichment Analysis*” que combina clusterProfile (Yu et al., 2012) e pathview (Luo & Brouwer, 2013). Apenas os termos que satisfizeram o valor $p < 0,05$ e o valor $q < 0,05$ foram considerados como enriquecimento significativo.

4. Resultados

4.1 Os transcritos do locus de RMEL3

Como regra geral, quando comparados aos mRNAs, os lncRNAs possuem menor conservação da sequência primária e um número menor de éxons, entretanto, esses éxons são mais longos e exibem uma expressão específica em cada tipo de célula (Kornfeld et al., 2017). O alto nível frequentemente observado de complexidade e diversidade de loci gênicos, no entanto, pode complicar significativamente a caracterização funcional dos lncRNAs. Portanto, uma análise cuidadosa da função do lncRNA deve começar com uma caracterização detalhada de seu locus genômico, especialmente se o lncRNA ainda não estiver caracterizado ou seu locus gênico não estiver bem anotado.

No início dos estudos com o lncRNA RMEL3 em nosso laboratório, o único transcrito descrito nos bancos de dados era o de 897 nt, nomeado de RMEL3_201 no ENSEMBL. Esse transcrito foi alvo das nossas investigações e vimos que ser diferencialmente expressa em melanoma (Goedert et al., 2016; Sousa et al., 2010) e possuir efeito ontogênico em células normais (Cardoso et al., 2019). Recentemente, outros transcritos começaram a ser anotados nos bancos de dados e a expressão destes transcritos começou a ser detectada através de dados de RNAseq. Atualmente, estão descritos seis transcritos para o loci de RMEL3 (Figura 4). A maioria dos transcritos disponíveis foram gerados por anotação automática a partir da sequência genômica.

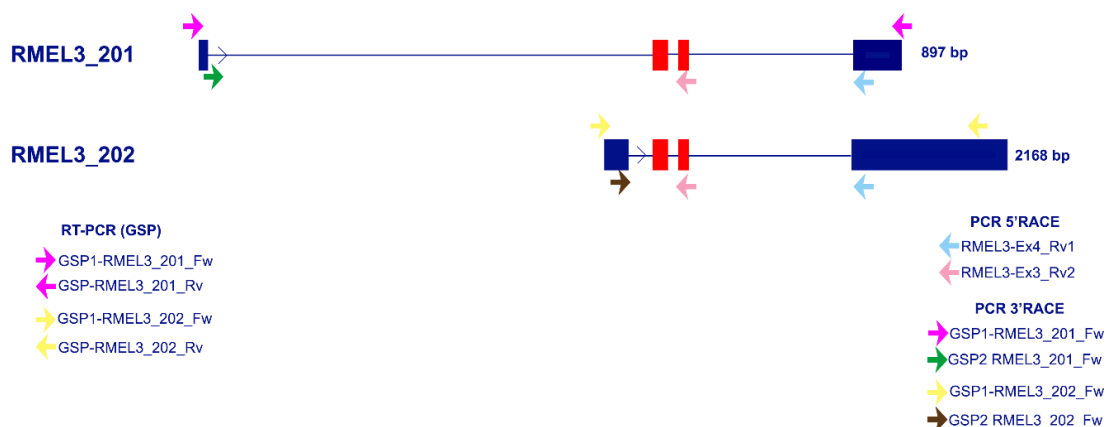


Figura 7 - Locais de anelamento dos primer utilizados nas RT-PCR e PCR 3'RACE e 5'RACE.

A fim de melhor caracterizar os transcritos, decidimos clonar o transcrito canônico das células de melanoma A375. Usando como modelo as sequências disponíveis no ENSEMBL, desenhamos primers para as extremidades 5' e 3' das isoformas

RMEL3_201 e RMEL3_202 (Figura 7), para amplificar e confirmar essas isoformas. Utilizamos cDNA diferentes com intuito de avaliar se a síntese do cDNA interferia na amplificação das isoformas (Figura 8). Quando utilizamos o par de primer GSP-RMEL3_202, que geraria um amplicon de 1534 nt, não obtivemos nenhum fragmento, o que nos levou a crer que esse transcrito não é expresso nas células A375, pelo menos não como é anotado no ENSEMBL. O resultado esperado da amplificação com o par de primer GSP-RMEL3_201 era um amplicon de 897 nt, entretanto o que observamos foram três fragmentos: um de ~850 pb, outra ~1000 pb e o último de ~1100-1200 bp (Figura 8).

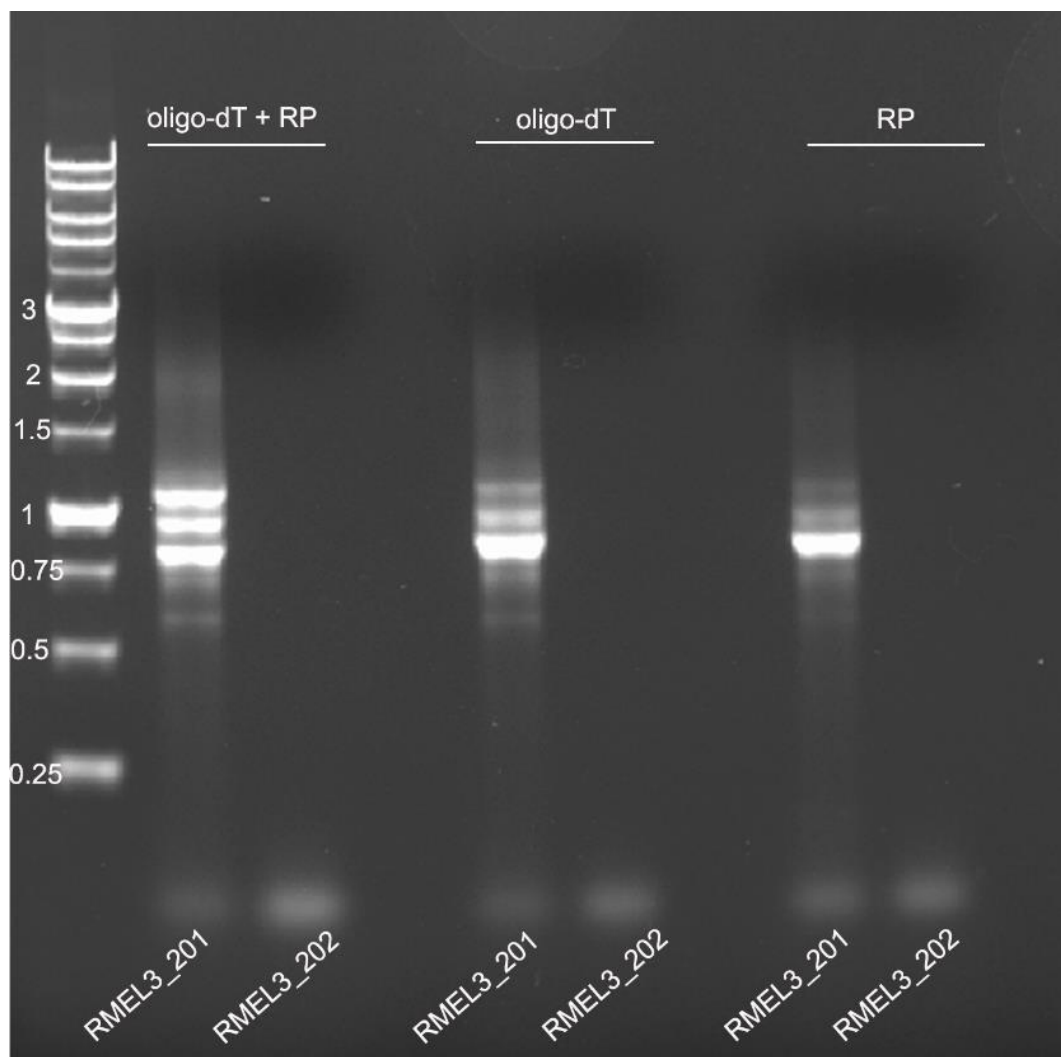


Figura 8 - Amplificação dos transcritos RMEL3_201 e RMEL3_202 com primers gene específico. Foram utilizados 5uL de cada cDNA de A375 sintetizado de maneira diferente na PCR com os primers específicos de RMEL3_201 e RMEL3_202. Nas duas primeiras raias, foi utilizado cDNA sintetizado com a mistura dos iniciadores oligo-dT e random primers (RP); nas duas raias seguintes foi utilizado o cDNA sintetizado com oligo-dT; e as duas últimas raias o cDNA foi sintetizado com RP.

Houve uma maior amplificação do amplicon de ~850 pb nos cDNAs sintetizados utilizando somente *random primers* (RP) ou somente com oligo-dT como iniciadores da transcrição reversa. Já no cDNA sintetizados com a mistura dos dois iniciadores, todas os fragmentos das três isoformas foram bem amplificados. Os amplicons obtidos com o cDNA oligo-dT+RP foram clonados no vetor pGEM-T-Easy, e depois foi confirmada a presença dos fragmentos nos plasmídeos por digestão com enzima de restrição (Figura 9). Dos cinco clones obtidos da clonagem com o amplicon de ~850 pb (pGEM_RMEL3.1), quatro tiveram a altura esperada e um ficou um pouco abaixo do tamanho dos demais. Selecionamos os clones 2 e 3 para o sequenciamento. Os clones pGEM_RMEL3.2 (amplicon ~1 Kb) tiveram tamanhos variados, isso deve ter acontecido porque durante a extração das bandas de PCR houve contaminação com as bandas vizinhas. Selecionamos os clones 2 e 5 para o sequenciamento, o 2 por ter o tamanho esperado e o 5 por ser diferente dos demais, que tem alturas semelhante os clones do amplicon ~850 pb. Por fim, dos clones do amplicon ~1,2 Kb, quatro tiveram a altura esperada e um foi um pouco mais alto do que os demais. Selecionamos os clones 1 (maior) e 2 para o sequenciamento.

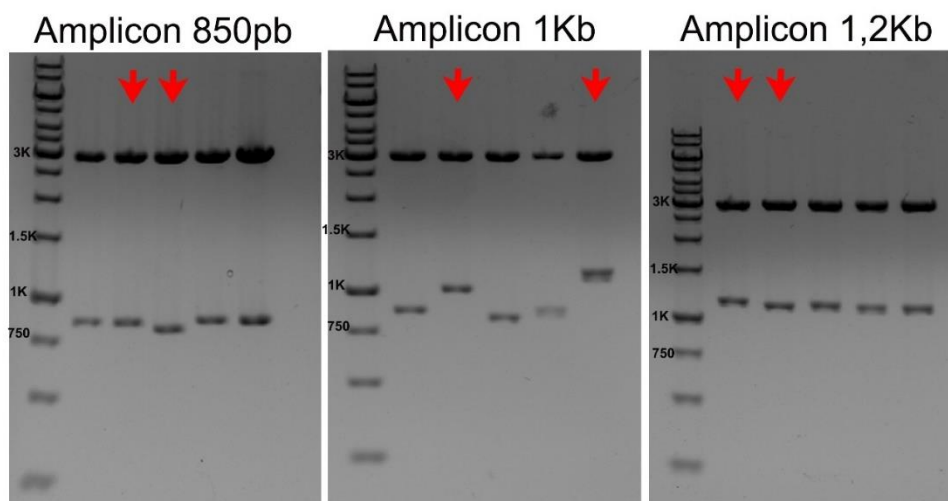


Figura 9 - Confirmação da inserção dos fragmentos de RMEL3_201 obtidos por PCR no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. Os clones obtidos após a clonagem dos produtos da PCR RMEL3_201 foram digeridos com a enzima de restrição EcoRI, que possui dois sítios de clivagem no vetor pGEM-T-Easy que flanqueiam a região de clonagem. Caso a inserção for eficaz, após a digestão com EcoRI o fragmento é destacado.

Após o sequenciamento, alinhamos as sequências dos clones com o genoma utilizando a ferramenta BLAT disponível no Genoma Browser (Kent, 2002), além de alinhar com as sequências disponíveis no ENSEMBL. As sequências dos clones obtidos

(Anexo 1) batem completamente com a sequência do locus de RMEL3. O transcrito canônico RMEL_201 de 897 pb na linhagem A375 possui 852pb (pGEM_RMEL3.1 clone 2). Isso ocorre porque há uma perda de 45pb no início do éxon 3. Essa perda foi observada em todos os clones sequenciados. O pGEM_RMEL3.1 clone 3 tem 809 pb, porque além da deleção do início do éxon 3, há também a deleção de 43 pb no final do éxon 1. Os clones das transformações pGEM_RMEL3.2 e pGEM_RMEL3.3 são maiores que o tamanho previsto pois possuem um éxon adicional. Esse éxon adicional corresponde ao éxon 1 parcial do RMEL3_202. No pGEM_RMEL3.2 clone 2, este éxon adicional possui 143 pb enquanto no clone 5 possui 245 pb. No pGEM_RMEL3.3 clone 1 o éxon 1 aparece com uma extensão de 16 pb no final, além do éxon adicional ter 276 pb, e no clone 2 o éxon adicional possui 258 pb (Figura 9). Observamos que o éxon 1 da isoforma anotada como RMEL3_202 é um éxon alternativo da isoforma canônica, mas menos extenso do que descrito para RMEL3_202 e contendo ao menos três junções alternativas de splicing, que geram éxons de 275-276, 258 e 143 nucleotídeos.

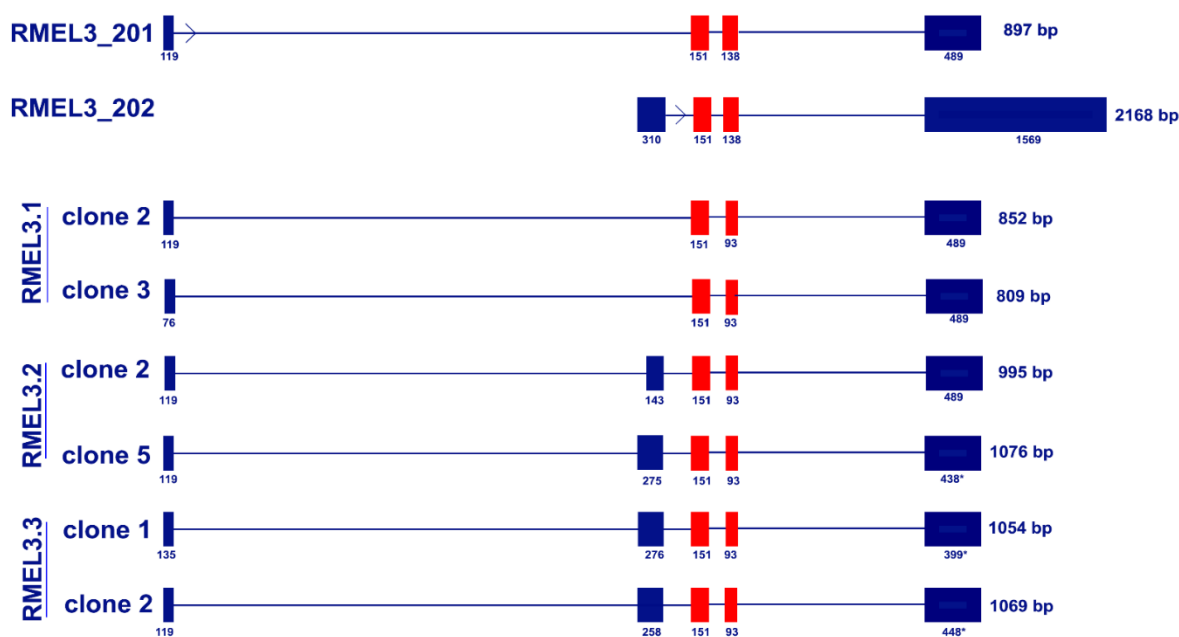


Figura 10 - Esquema dos clones oriundo da amplificação de RMEL3_201. As sequências dos clones das ligações pGEM_RMEL3.1, pGEM_RMEL3.2 e pGEM_RMEL3.3 obtidas após o sequenciamento Sanger foram alinhadas com o genoma humano e todos os clones alinharam no locus genômico de RMEL3. Os retângulos representam os éxon e as linhas representam os íntrons. Embaixo de cada éxon está o tamanho em pares de base (pb), e o * indica que o final do éxon não foi sequenciado com eficiência.

Os resultados obtidos com a amplificação de RMEL3_201 com primer específicos serviu para elucidar a parte central do RMEL3. O éxon 2 e o éxon 3 parcial do RMEL3_201 foi constante em todos os clones obtidos, nos indicando que são a região

mais conservada do locus. Como as extremidades 5' e 3' não estão completamente elucidadas, optamos por realizar a técnica de RACE para tentar caracterizar os transcritos conhecidos e checar se não há novos.

4.1.1 Identificação de dois éxons novos de RMEL3 não anotados em bancos de dados

Para realizar a técnica 5'RACE PCR, foi feita a síntese do cDNA *template-switching* com o RNA extraído das células de melanoma A375 e das células de rim embrionário HEK293T, que foi utilizada como controle negativo pois não tem expressão de RMEL3. A 5'RACE PCR#1 foi feita utilizando um GSP que anela no início do éxon 4. Após algumas tentativas não efetivas utilizando a reação diluída como produto para a 5'RACE PCR#2, decidimos extrair o DNA de seis regiões do gel de agarose após a corrida para utilizar como template da próxima reação (Figura 11A). Os produtos gerados na 5'RACE PCR#2 foram de três alturas diferentes: a menor de aproximadamente 400 pb, uma intermediária de aproximadamente 550 pb e uma maior de 650 pb (Figura 11B). Os fragmentos foram purificados do gel e clonados no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. Para checar a clonagem, o inserto foi destacado por digestão com a enzima de restrição EcoRI. A clonagem com o fragmento maior (~650 pb) não gerou clones. Foram selecionados três clones (indicados em vermelho) para o sequenciamento: pGEM_5RACE.1 clone 2, pGEM_5RACE.2 clones 1 e 6 (Figura 11C).

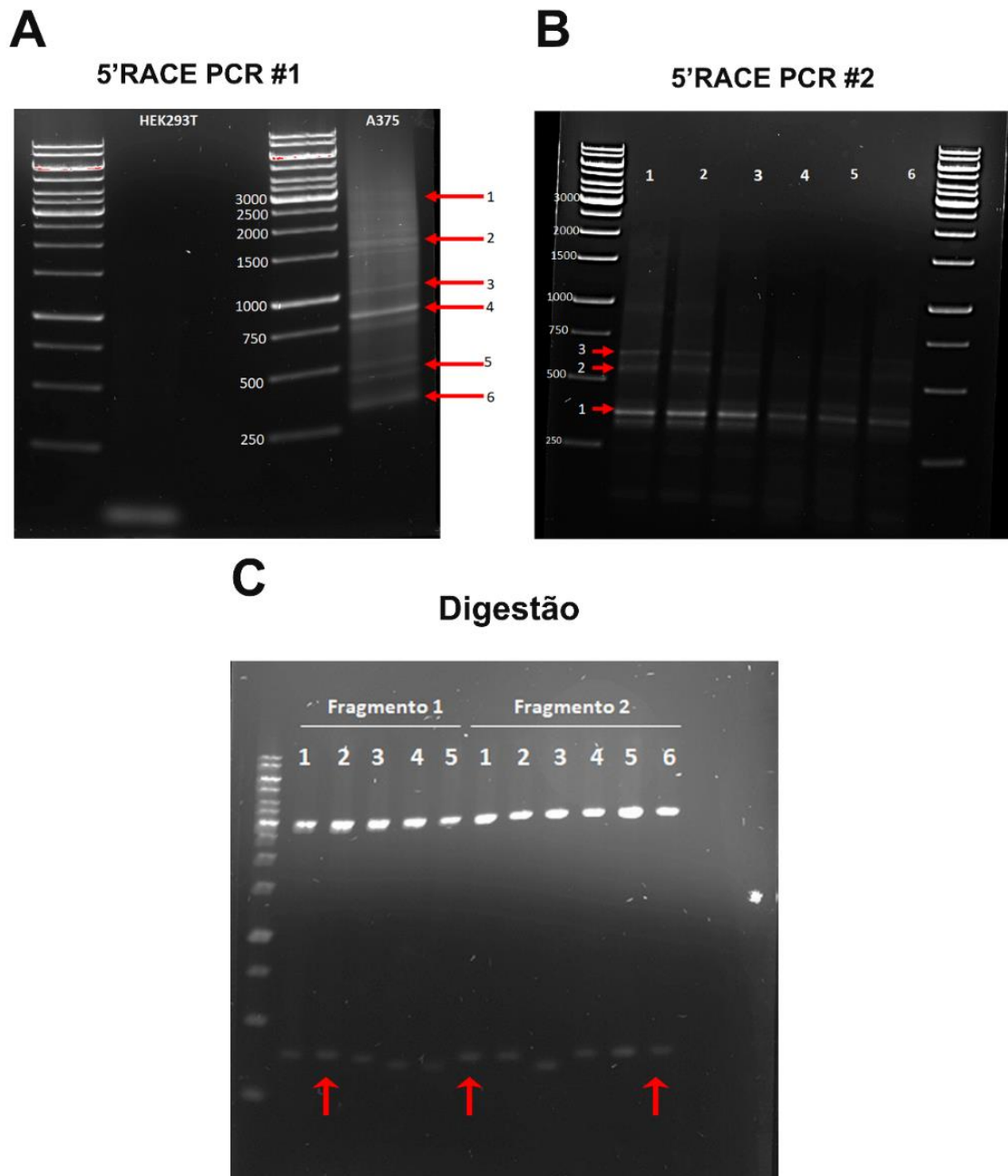


Figura 11 - Eletroforese em agarose dos produtos das 5'RACE PCR e da digestão dos clones obtidos. (A) Gel 1% agarose com os produtos da 5'RACE PCR#1 feitas com o cDNA da HEK293T e A375. As setas vermelhas indicam as regiões que foram cortadas para extração do DNA que será utilizado na próxima etapa. (B) Gel 1% agarose dos produtos da 5'RACE PCR utilizando os DNAs extraídos das seis regiões demarcadas em A. As setas vermelhas indicam as bandas excisadas e posteriormente purificadas. O DNA dessas bandas foi clonado no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. (C) Gel de agarose 1% com as digestões com EcoRI dos clones obtidos com os fragmentos 1 e 2 de B. As setas vermelhas indicam os plasmídeos selecionados para o sequenciamento.

Para o 3'RACE, decidimos testar dois métodos de síntese de cDNA: o de Green & Sambrook (2019), que chamamos de cDNA 1, e o método de Scotto-Lavino et al. (2007), designado de cDNA 2. O cDNA das células HEK293T utilizado como controle sintetizado como o cDNA1. A 3'RACE PCR#1 foi realizada com um primer que anela

no éxon 1 canônico e gerou fragmentos bem escassos, e em várias alturas (Figura 12B). Mas quando fizemos a 3'RACE PCR#2 com o GSP anelando no éxon 3, as bandas ficaram mais limpas e apareceram três bandas predominantes nas alturas de aproximadamente 300 pb, 750 pb e acima de 1 kb (Figura 12B). Os clones gerados pela clonagem desses bandas foram confirmados por digestão com EcoRI e selecionados um de cada fragmento para o sequenciamento. Foram selecionados: pGEM_3RACE.1 clone 2; pGEM_3RACE.2 clone 4 e pGEM_3RACE.3 clone 6 (Figura 12C). Assim no PCR com os primers GSP, as amostras onde utilizamos o primer anelando no início do éxon 1 do transcrito RMEL3_202 não amplificou nenhum fragmento.

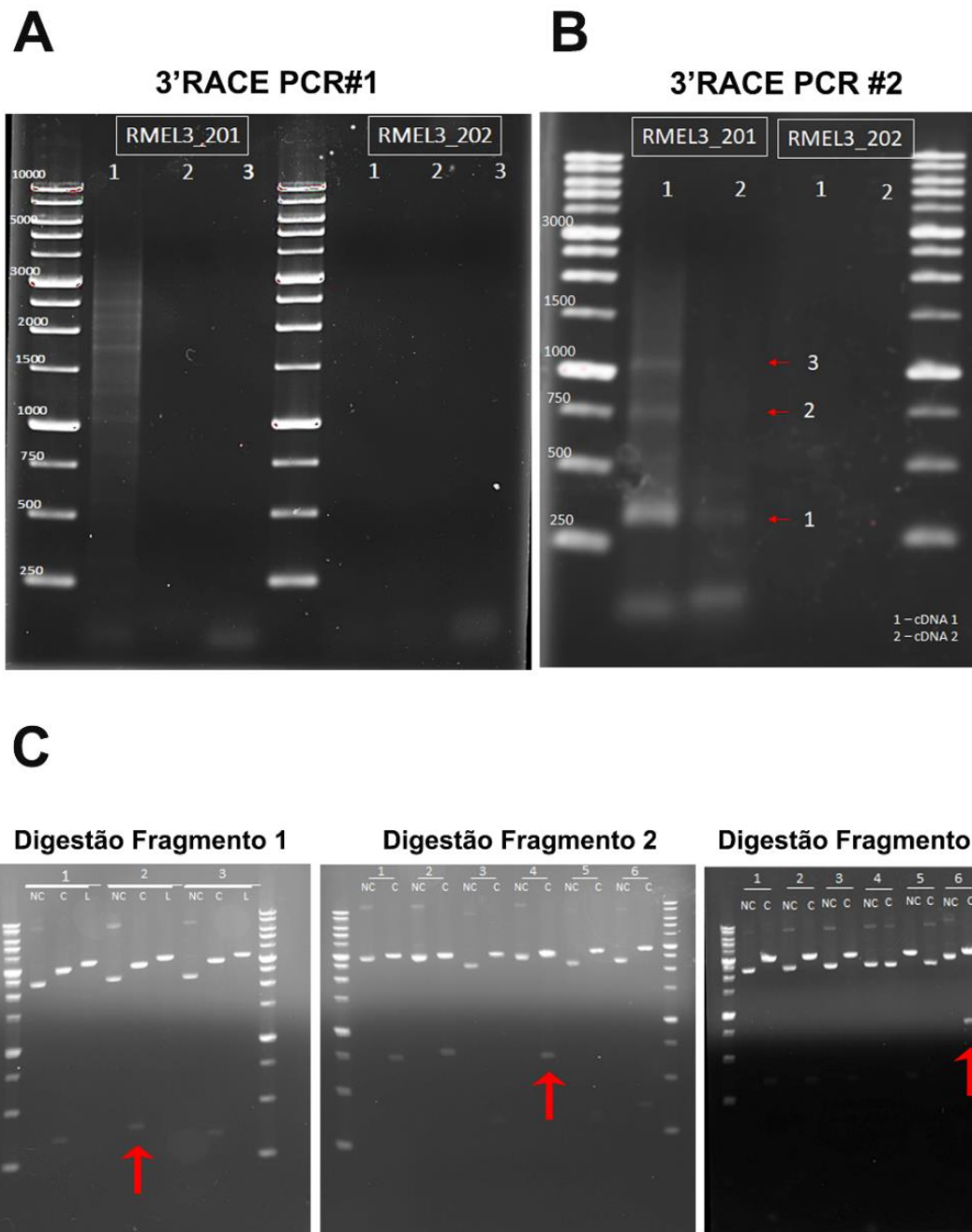


Figura 12 - Eletroforese em agarose dos produtos das 3'RACE PCR e da digestão dos clones obtidos. (A) Gel 1% agarose com os produtos da 3'RACE PCR#1 feitas com o cDNA da HEK293T e A375. Na linha 1 a reação feita com o cDNA sintetizado pelo método de Green e Sambrook (2009), a linha 2 foi com cDNA sintetizados pelo método de Scotto-Lavino (2007), e a linha 3 é com o cDNA de HEK293T. (B) Gel 1% agarose dos produtos da 3'RACE PCR utilizando como template o produto da PCR#1 diluído 1:10. As setas vermelhas indicam as bandas excisadas e posteriormente purificadas. O DNA dessas bandas foi clonado no vetor de sequenciamento pGEM-T-Easy. (C) Gel de agarose 1% com as digestões com EcoRI dos clones obtidos com os fragmentos 1, 2 e 3 de B. As setas vermelhas indicam os plasmídeos selecionados para o sequenciamento.

Após o sequenciamento dos clones oriundos da transformação com os fragmentos obtidos por 3'RACE e 5'RACE, foi feito o alinhamento utilizando a ferramenta BLAT disponível no Genoma Browser, além de alinhar com as sequências disponíveis no ENSEMBL. Todos os clones sequenciados alinharam no locus genômico do RMEL3,

validando a eficiência e especificidade dos métodos usados. Dos três clones obtidos por 5'RACE, os pGEM_5RACE.1 clone 2 e o pGEM_5RACE.2 clone 6 eram iguais com 327 pb. Esses clones eram compostos por um éxon inicial de 110 pb totalmente novo e que não está anotado em nenhum dos bancos de dados. Esse éxon alinha 1264 nt antes do início conhecido de RMEL3_201. O éxon imediato é o 2 do transcrito RMEL3_201, seguido pelo éxon 3 parcial (Figura 13). O terceiro clone pGEM_5RACE.2 clone 1 era composto pelos éxons 1, 2 e uma parte do 3. O que nos chamou a atenção foi o éxon 1 tem um início diferente do que conhecíamos. Na realidade, o éxon inicia 26 pb antes do que está anotado nos bancos de dados, ou seja, o éxon na realidade tem 145 pb (Figura 13).

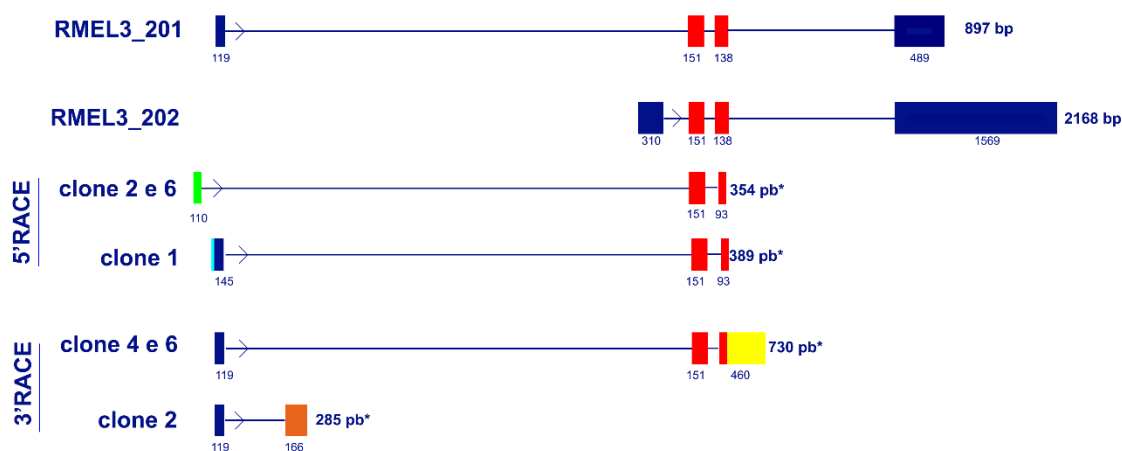


Figura 13 - Esquema dos transcritos obtidos após PCR 5'RACE e 3'RACE com cDNA das células A375. As seqüências dos clones das ligações pGEM_5RACE.1, pGEM_5RACE.2, pGEM_3RACE.1, pGEM_3RACE.2 e pGEM_3RACE.3 obtidas após o sequenciamento Sanger foram alinhadas com o genoma humano e todos os clones alinharam no locus de RMEL3. Os retângulos representam os éxon e as linhas representam os íntrons. Embaixo de cada éxon está o tamanho em pares de base (pb). Os retângulos verde, ciano, amarelo e laranja representa as regiões dos transcritos que não estão anotadas em bancos de dados e identificadas através dos métodos de 5'RACE e 3'RACE. O tamanho total dos transcritos estão com * pois se trata de transcritos incompletos obtidos com primers internos de RMEL3_201.

Dos três clones obtidos com os fragmentos do 3'RACE, dois eram idênticos assim como aconteceu com a extremidade 5'. O pGEM_3RACE.2 clone 4 e pGEM_3RACE.3 clone 6 são iguais: possuem o éxon 1 e 2 exatamente como está anotado, o éxon 3 parcial como encontrado em todos os transcritos, só que diferente dos demais, esse éxon possui uma extensão de 367 pb seguida de uma cauda poli(A) (Anexo 3). Essa extensão não está descrita em nenhum banco de dados até o momento, sendo então esse transcrito completamente desconhecido até o momento. O pGEM_3RACE.2 clone 4 possui outro éxon novo, este localizado no maior íntron do locus de RMEL3 entre os éxons 1 e 2 do RMEL3_201, e inicia 12706 nt após o éxon 1 do RMEL3_201. Não conseguimos

recuperar nenhum fragmento de transcritos cujo o éxon final é o éxon 4 dos transcritos RMEL3_201 e 202.

Afim de checar se os transcritos oriundos da amplificação afeita com primers específicos para o RMEL3_201 (Figura 10) possuem a extensão 5' do éxon 1 e se são expressos em outras células, fizemos uma RT-PCR com cDNA das células de melanoma SKMEL28 e a WM902B, e nas células não tumorais HEK293T e HUVEC com um primer *sense* reconhecendo a extensão identificada e o primer *anti-sense* anelando no final do éxon 4 do RMEL3_201 (Figura 14A). Vimos que não houve detecção de nenhuns dos transcritos de RMEL3 nos cDNA das células HEK293T e HUVEC. Já nas células de melanoma, observamos que a SKMEL28 e WM902B também expressam os transcritos com o éxon alternativo, assim como a A375, e que a extensão 5' do éxon 1 é comum em todos os transcritos identificados. Quando observamos atentamente, percebemos que as bandas da SKMEL28 e WM902B são ligeiramente mais altas que as da A375 (Figura 14B), isso pode nos indicar que o éxon 3 dessas linhagens não tiveram a deleção de bases como ocorre na A375. É possível observar principalmente na A375 duas bandas fracas acima da terceira banda na altura de 1,15 kB, podem ser novas isoformas que não identificamos como a descrita no NONCODING (Figura 4).

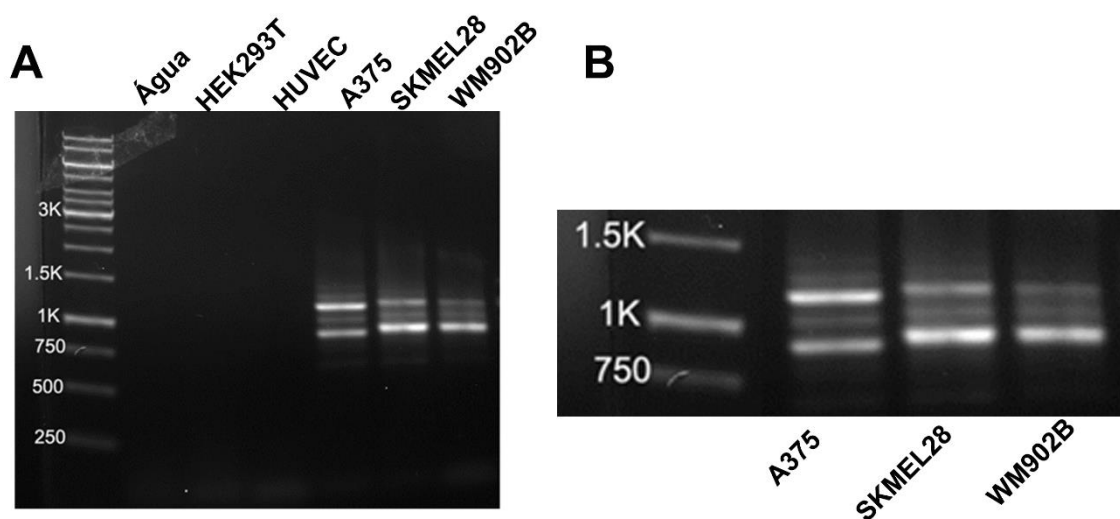


Figura 14 - Amplificação com primers gene específico RMEL3_201 utilizando os cDNAs de células não tumorais e de melanoma. Foram utilizados cDNA das células não tumorais HEK293T e HUVEC e das células de melanoma A375, SKMEL28 e WM902B para a amplificação dos transcritos de RMEL3_201 e suas versões com éxon alternativo. **(B)** Maior aumento das bandas obtidas em A para melhor visualização da diferença na altura das bandas de A375 em relação as demais e das duas bandas acima da terceira banda de A375, que pode corresponder aos transcritos do NONCODING.

4.1.2 Validação dos transcritos de RMEL3 com dados de RNAseq do ENCODE

Com os resultados obtidos até o momento, podemos dizer que o locus de RMEL3 tem ao menos nove transcritos possíveis. Para validar os dados dos transcritos encontrados, confrontamos nossas sequências com resultados de RNAseq da linhagem de melanoma A375 (código da série: [GSE78652](#)) disponibilizados pelo ENCODE Project Consortium (2016). Esta análise nos permitiu confirmar a extensão 5' do éxon 1 e da maioria dos éxons alternativos e junções alternativas de *splicing* detectadas (Figura 15).

Além disso, em busca de checar se o TSS do transcrito canônico seria realmente coincidente com o terminal 5' da extensão do éxon 1 identificada por nós, buscamos por dados de identificação de promotores nos bancos de dados. Encontramos dados obtidos pelo método de RAMPAGE RNAseq (Batut e Gingeras, 2013), em RNA extraído da linhagem A375 (ENCODE Project Consortium; [GSM2343188](#); [GSM2343189](#)). O RAMPAGE (*RNA Annotation and Mapping of Promoters for Analysis of Gene Expression*) é um método para a identificação, em todo o genoma, dos sítios de início da transcrição (TSS) e a quantificação da atividade do promotor. O método é baseado na síntese de cDNAs complementares 5' completos a partir de amostras de RNA total de eucariotos, seguida do sequenciamento em plataformas Illumina de alto rendimento. Esta metodologia utiliza a mesma abordagem que utilizamos no 5'RACE para obtenção de terminais 5' completos dos RNAs, isto é, faz uso de propriedades únicas de certas enzimas transcriptase reversa de adicionar sequências adaptadoras ao final dos cDNAs 5' completos, como explicamos no Item 3.4.

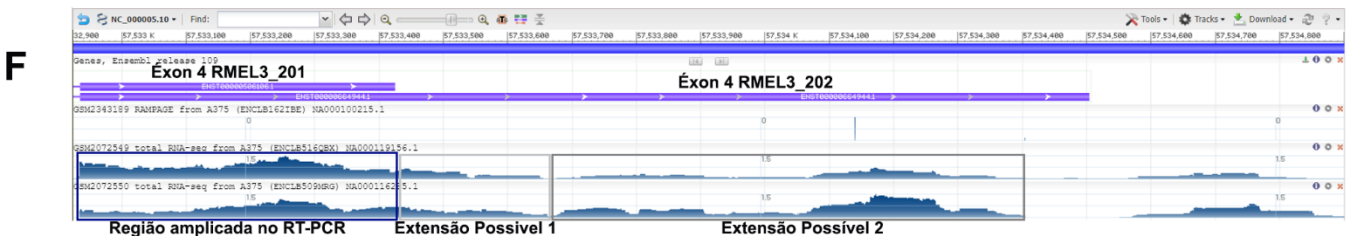
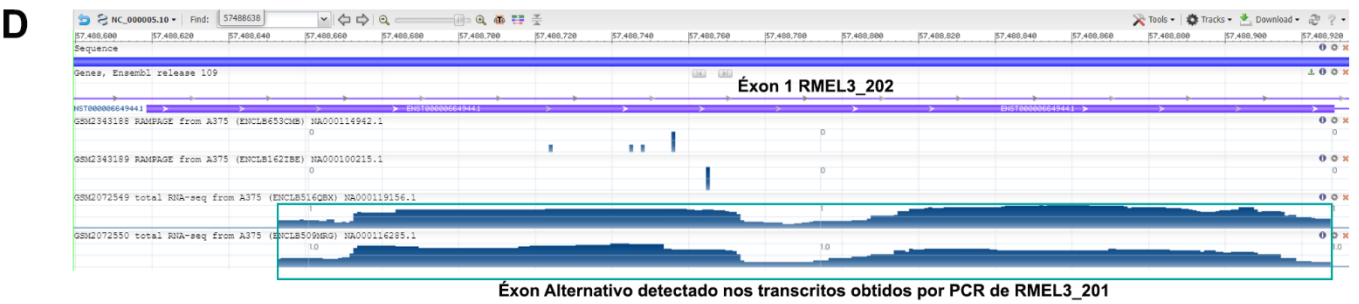
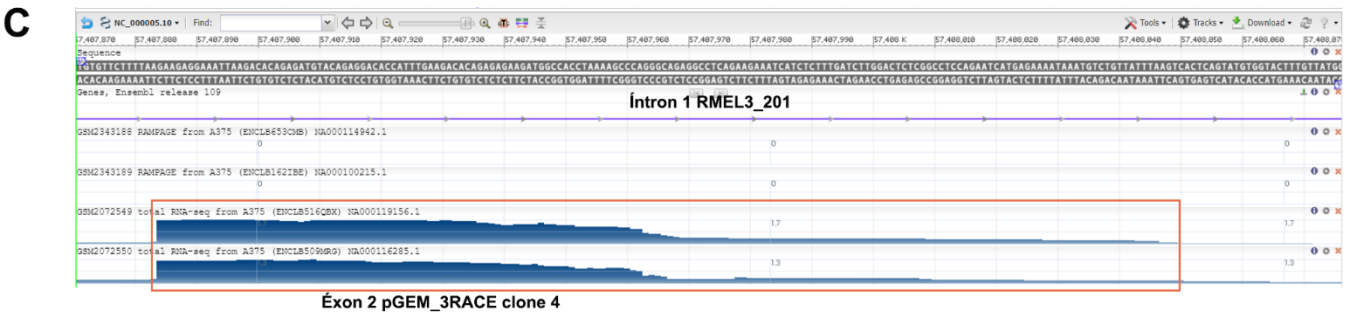
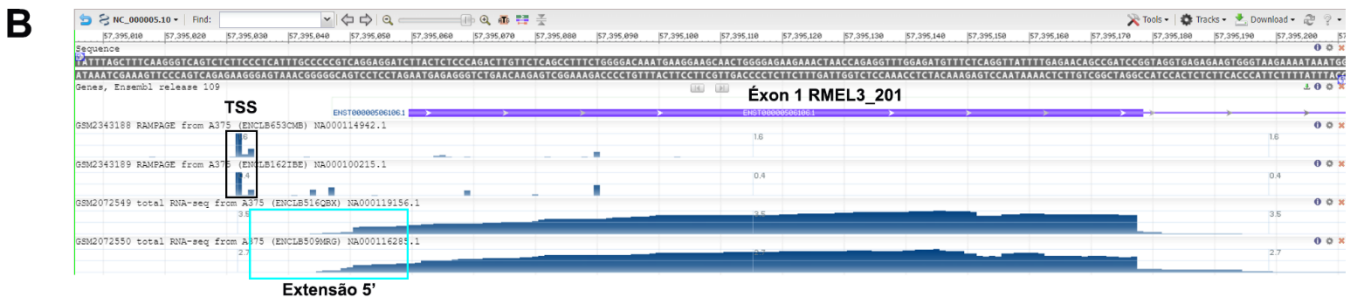
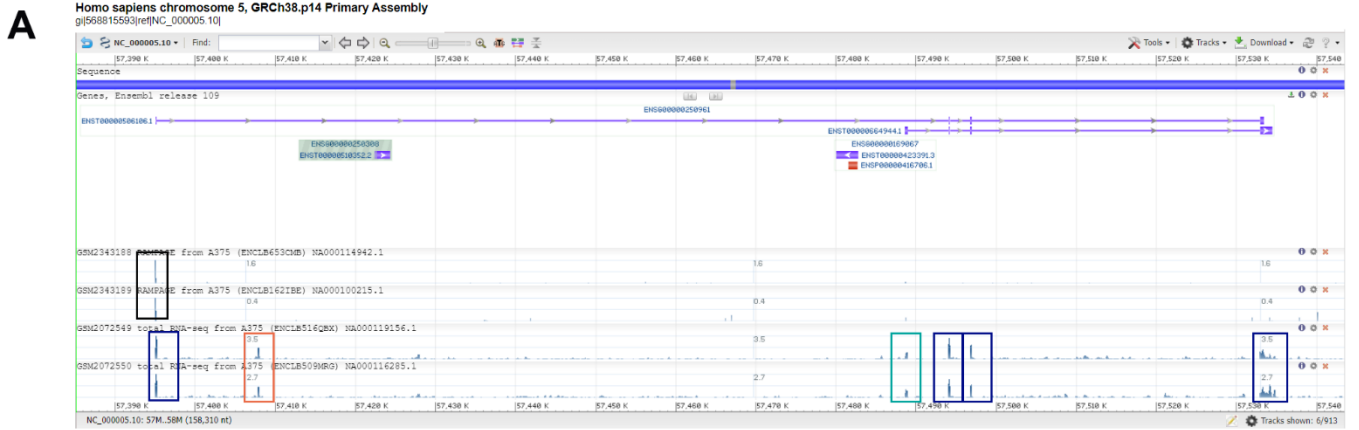


Figura 15 - Análises do locus do RMEL3 a partir de RNaseq e RAMPAGE RNaseq da linhagem de melanoma A375. Utilizando o Genoma Data Viewer do NCBI, analisamos o RAMPAGE RNaseq de A375 (duas primeiras linhas) e RNaseq total de A375 (duas linhas finais). **(A)** Locus RMEL3 sinalizado com a linha grossa azul no início do quadro, seguido pelos transcritos anotados RMEL3_201 e RMEL3_202, em roxo. Estão destacadas as regiões: (1) TSS do éxon 1 - retângulo preto; (2) Picos correspondentes aos éxons do RMEL3_201 - retângulos azuis; (3) Pico correspondente ao éxon localizado no íntron 1 - retângulo laranja; (3) Pico correspondente ao éxon 1 do RMEL3_202- retângulo verde. **(B)** Região do éxon 1 do RMEL3_201: em preto, a região de início de transcrição (TSS) que possui 5 pb; em ciano estão destacados os 26 pb da extensão 5' do éxon 1. **(C)** Região do íntron 1 do RMEL3_201 com o pico de detecção que corresponde ao éxon final do encontrado por 3'RACE, destacado em laranja. **(D)** Região destacada do éxon 1 do RMEL3_202 correspondente ao éxon alternativo das isoformas encontradas nos transcritos obtidos por PCR **(E)** Região do éxon 3 do RMEL3_201 e RMEL3_202 onde está destacado em azul o pico correspondente a esse éxon iniciando 45 nt a jusante do início anotado, e em amarelo, o sinal de RNaseq que corresponde exatamente a região de extensão 3' observado por 3'RACE. **(F)** Região correspondente ao éxon 4 do RMEL3_201 e RMEL3_202, destacado em azul a sequência do éxon 4 já confirmada nos transcritos obtidos por PCR, e em cinza as duas possíveis extensões do éxon 4 de RMEL3_201.

O terminal 5' identificado através de 5'RACE é CCTCA. Os dados de RAMPAGE mostram que o TSS (Figura 15B - retângulo preto) mais provável mapeado para as isoformas de RMEL3 que se iniciam no éxon 1 é o primeiro T a montante da extremidade identificada (CTTCCCTCA) (Figura 15B - retângulo ciano). A maioria dos promotores de eucariotos não usam uma única posição como TSS, mas sim permitem o início em múltiplas posições (Carninci et al., 2006).

Nos RNaseqs de A375 que analisamos, observamos um pico no íntron 1 perto do final do éxon 1 (Figura 15C) que corresponde exatamente com o novo éxon terminal que encontrado por 3'RACE (Figura 13), o que reforça a existência de um transcrito curto e até o momento desconhecido. Também observamos nos dados de RNaseq que o pico correspondente ao éxon 1 do transcrito anotado RMEL3_202 não inclui as 35 nt iniciais do éxon de 310 nt, o que coincide perfeitamente com o observado em nossos transcritos obtidos por PCR (Figura 15D e Figura 10). Nessa região aparentemente há dois picos de RNaseq, e quando confrontamos com nossas sequências, vimos que o início do primeiro pico corresponde ao início do éxon alternativo dos clones 1 e 5 (Figura 10) e o início do segundo corresponde ao clone 2 (Figura 10; Figura 15D). O éxon 2 não apresentou nenhuma diferença em relação às sequências anotadas, nem em nossos transcritos nem nos dados de RNaseq. A perda dos 45 nucleotídeos iniciais do éxon 3 do RMEL3_201 visto em nossos transcritos também aparece nos dados de RNaseq, confirmando que esse padrão de *splicing* é específico da linhagem A375 (Figura 15E). Nessa região, observa-se um pico bem discreto na região correspondente à extensão 3' do éxon 3 observada nos transcritos obtidos por 3'RACE, sugerindo que esse transcrito possa ter uma baixa expressão nessa linhagem (Figura 15E – retângulo amarelo).

Por fim, quando observamos a região correspondente ao éxon 4 do RMEL3_201, vemos que o pico se estende muito além do final anotado desse transcrito. Isso pode

indicar que o éxon seja maior, mais parecido com o éxon 4 do transcrito RMEL3_202. Levando em consideração o padrão que observamos em nossas análises, nós sugerimos que esse éxon tenha duas possíveis regiões 3', como destacamos na Figura 15F. Vimos que ao final da região que chamamos de “Extensão possível 1”, o pico tem uma queda brusca, o que pode indicar uma terminação do éxon naquela região e resultaria em uma extensão de 241 nucleotídeos no éxon 4 descrito em RMEL3_201. Após essa queda, o pico volta a aumentar, o que pode indicar que existam transcritos onde essa extensão do éxon 4 seja maior ainda (uma extensão de 738 nucleotídeos). Ainda não obtivemos a confirmação do tamanho exato do éxon 4 experimentalmente como realizado com o éxon 1. Entretanto, baseado nessas evidências, é possível que o éxon 4 seja mais extenso do que o que conseguimos amplificar até o momento.

Em resumo, até o momento conseguimos identificar nove transcritos oriundos do locus de RMEL3. Afim de tornar a visualização das características desses transcritos mais fácil, fizemos um último esquema (até o momento) reunindo todos os nossos achados. Como esses transcritos foram obtidos da linhagem A375, denominados eles de T-A375 (Transcritos da A375), onde destacamos em azul escuro os éxons do RMEL3_201 detectados nos demais transcritos, e as novas regiões foram destacadas em ciano (extensão 5' éxon1), verde-água (éxon 1 RMEL3_202), verde (novo éxon iniciador), amarelo (extensão 3' do éxon 3) e laranja (novo éxon terminal) (Figura 16).

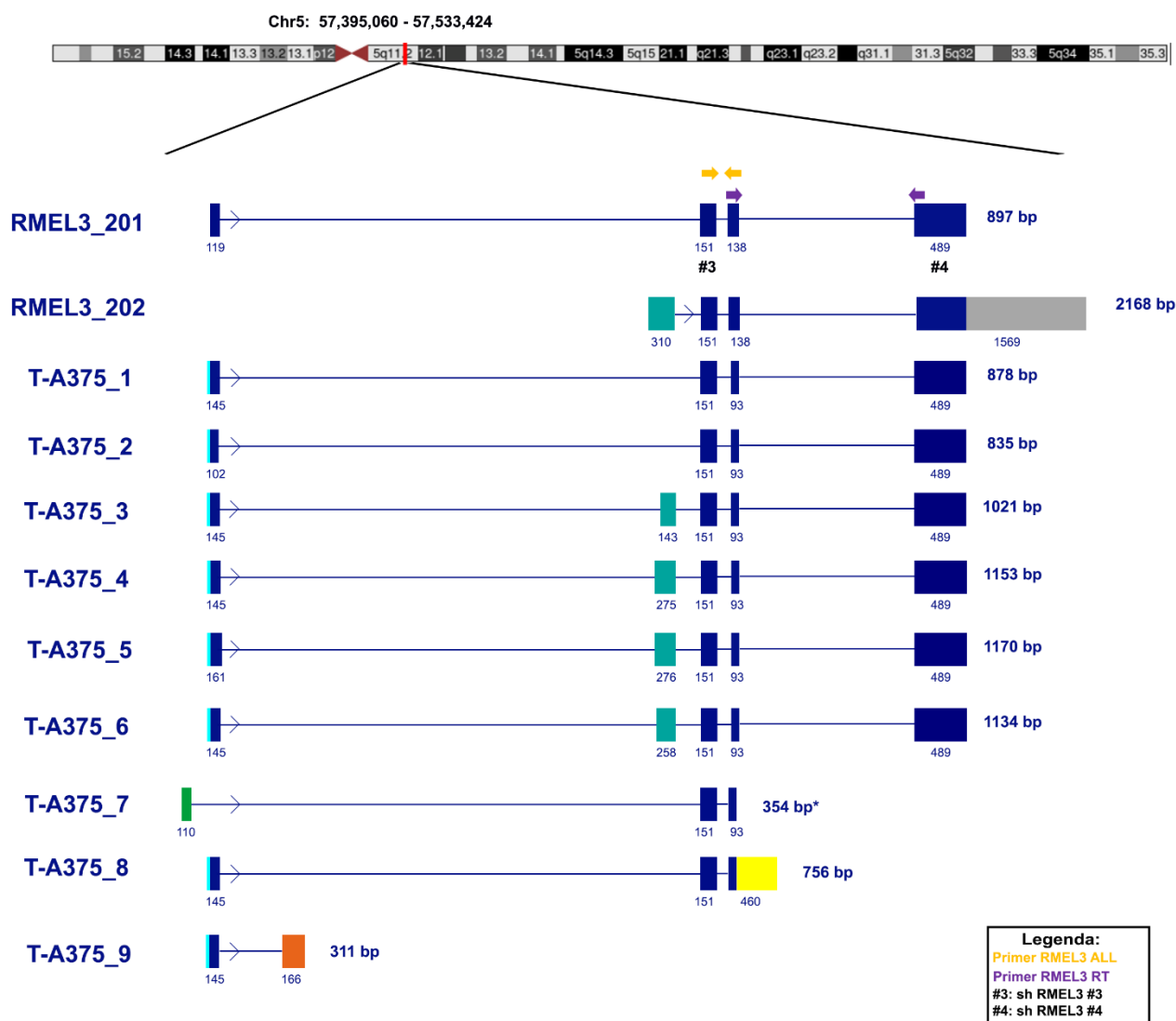


Figura 16 - Transcritos confirmados do locus de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 (T-A375_1 a 9). Ilustração do locus do gene RMEL3 e a organização éxon-íntron dos transcritos anotados, RMEL3_201 e RMEL3_202 [éxons (retângulos) e íntrons (linhas)]. Os éxons compartilhados com RMEL3_201 (ENSEMBL) estão coloridos em azul escuro. As regiões ou éxons novos que não fazem parte do canônico estão em: (1) extensão 3' do RMEL3_202, em cinza; (2) extensão 5' do éxon 1; (3) inserção de partes (143, 275-276 ou 258 pb) do éxon 1 do RMEL3_202 na sequência do RMEL3_201; (4) extensão 3' do éxon 3 do RMEL3_201, em amarelo; (5) um éxon novo dentro do íntron 1 do RMEL3_201. As setas representam os primers utilizados para avaliar a expressão geral de RMEL3 por qRT-PCR, e os # sinalizam a região de reconhecimento dos shRNA utilizados no silenciamento de RMEL3. O T-A375_7 não tem confirmação do éxon final, por isso tem * no tamanho do transcrito.

4.2 Distribuição subcelular dos transcritos de RMEL3

A função molecular exercida por um lncRNA está intimamente ligada com sua localização subcelular. Afim de verificar a localização subcelular dos transcritos de RMEL3 nas células de melanoma, realizamos a hibridização *in situ* por fluorescência de RNA (RNA-FISH). Temos disponíveis em nosso laboratório cinco sondas de DNA

marcadas com 5'Cy e que hibridizam regiões dos éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201, o que sabemos agora, será capaz de marcar todos os transcritos identificados até o momento, pois os éxon 1 e 2 são comuns para oito dos novos transcritos (Figura 16).

Como controle negativo de marcação e para checar a especificidade das nossas sondas, utilizamos as células HEK297T (Figura 17 – Primeira linha), e não foi observado marcação nessas células. Realizamos a marcação em três linhagens de melanoma A375 (principal modelo celular desse trabalho), SKMEL28 e WM902B. A marcação nas células A375 ficou muito mais forte e nítida em comparação com as demais células, o que era esperado visto que a expressão de RMEL3 é maior nessa linhagem (Figura 17). Devido a essa marcação mais nítida, é possível detectar a presença de RMEL3 amplamente distribuído no citoplasma e no núcleo das células A375 (Figura 17 – Segunda linha). Nas células SKMEL28 e WM902B é visto uma marcação mais intensa no citoplasma, o que pode indicar que há uma predominância de RMEL3 nesta localização em comparação ao núcleo nestas células (Figura 17 – Terceira e quarta linha).

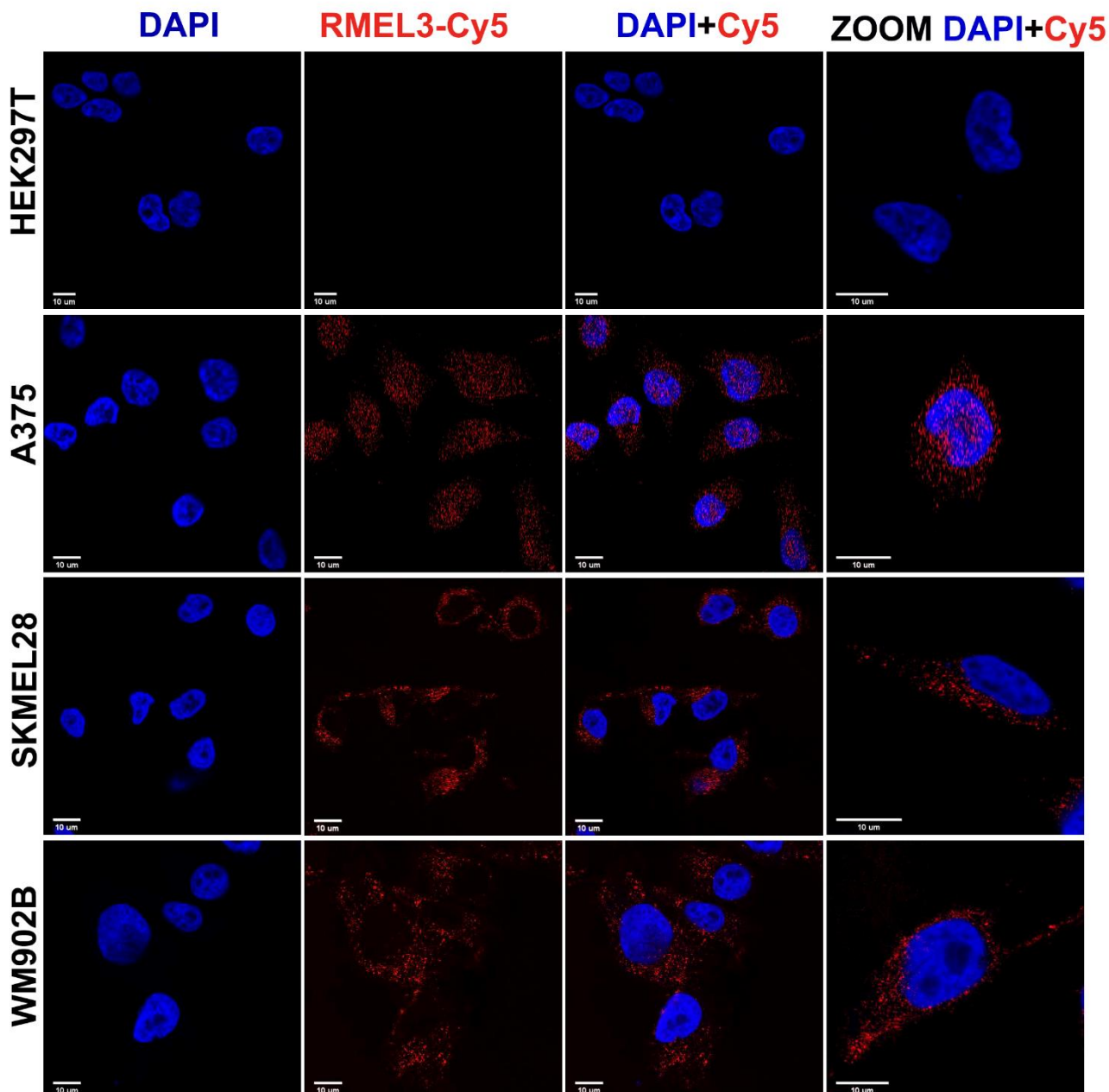


Figura 17 – Distribuição subcelular de RMEL3 visto por RNA-FISH. Foi realizado a marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 nas linhagens celulares HEK293T, A375, SKMEL29 e WM902B. As células HEK293T foram utilizadas como controle negativo para RMEL3, visto que não expressam esse lncRNA. O núcleo das células foi corado com DAPI. Barra de escala: 10µm

A especificidade das sondas utilizadas também foi testada nas células A375 silenciadas para RMEL3 com shRMEL3 #4. Como comentaremos mais detalhadamente no próximo tópico, o shRMEL3 #4 foi desenhado para reconhecer o éxon 4 do transcrito RMEL3_201, então ele promove o silenciamento de ao menos seis transcritos de A375. Nas imagens de RNA-FISH é possível ver a redução drástica na marcação de RMEL3 nas células silenciadas quando comparado ao controle (Figura 18). A marcação de

RMEL3 restante provavelmente é dos transcritos que não possuem o éxon 4 e por consequência não são alvo do shRMEL #4.

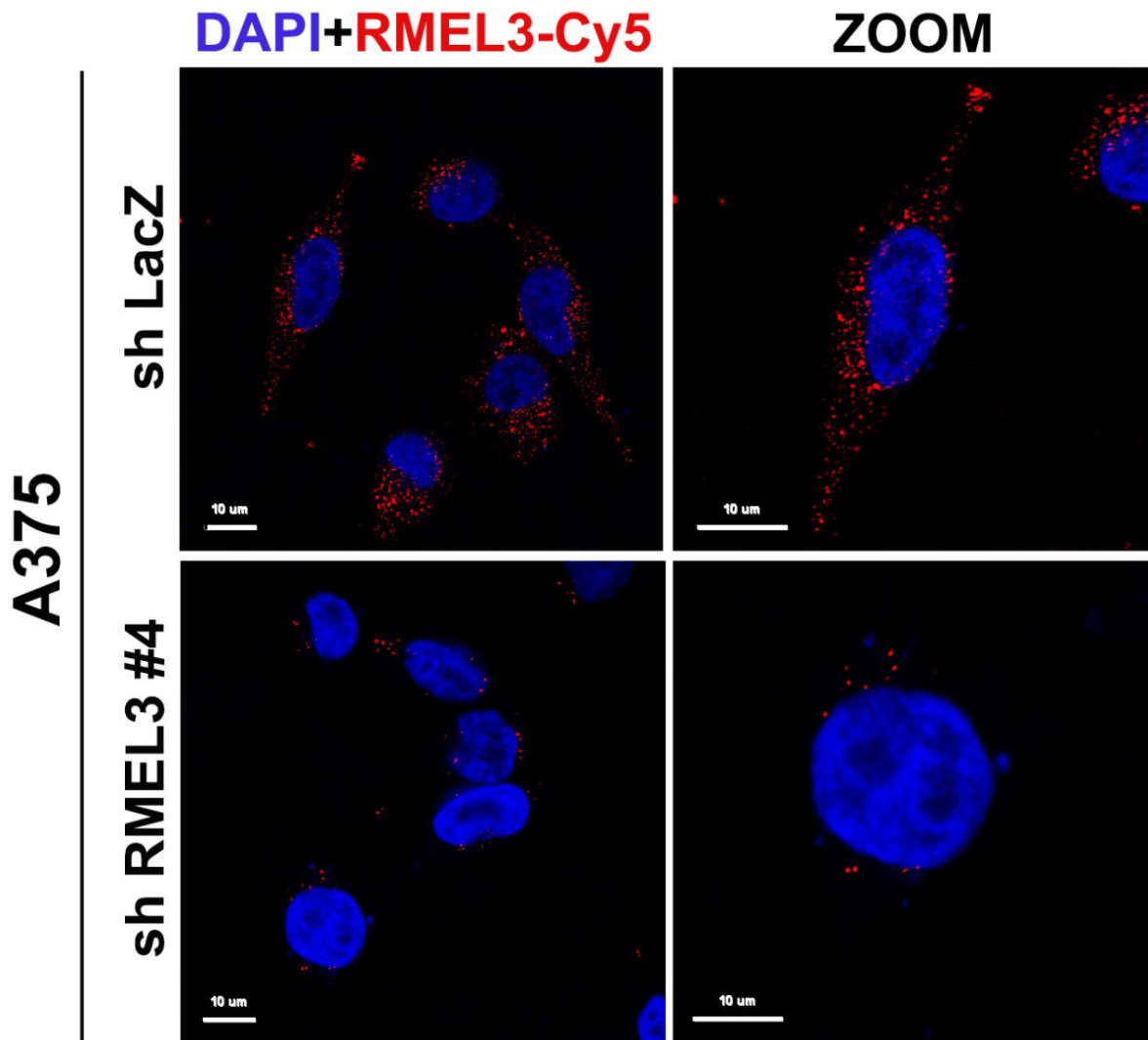


Figura 18 - Marcação de RMEL3 na célula silenciada com shRNA. A marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 na linhagem de melanoma A375 controle com expressão de RMEL3 (sh LacZ) e na A375 silenciada para RMEL3 (shRMEL3 #4).

Adquirimos imagens da A375 no eixo Z (Z-stack) afim de melhor analisar a distribuição do RMEL3 ao longo da célula, além de nos permitir uma reconstrução 3D das células. Na Figura 19 podemos ver uma fatia focada no meio das células e um recorte dos eixos X e Y, e é possível ver que o RMEL3 está localizado tanto no citoplasma quando no núcleo. Pelo fato das sondas hibridizarem em dois éxons mais comuns, não é possível discriminar qual o transcrito marcado.

A375

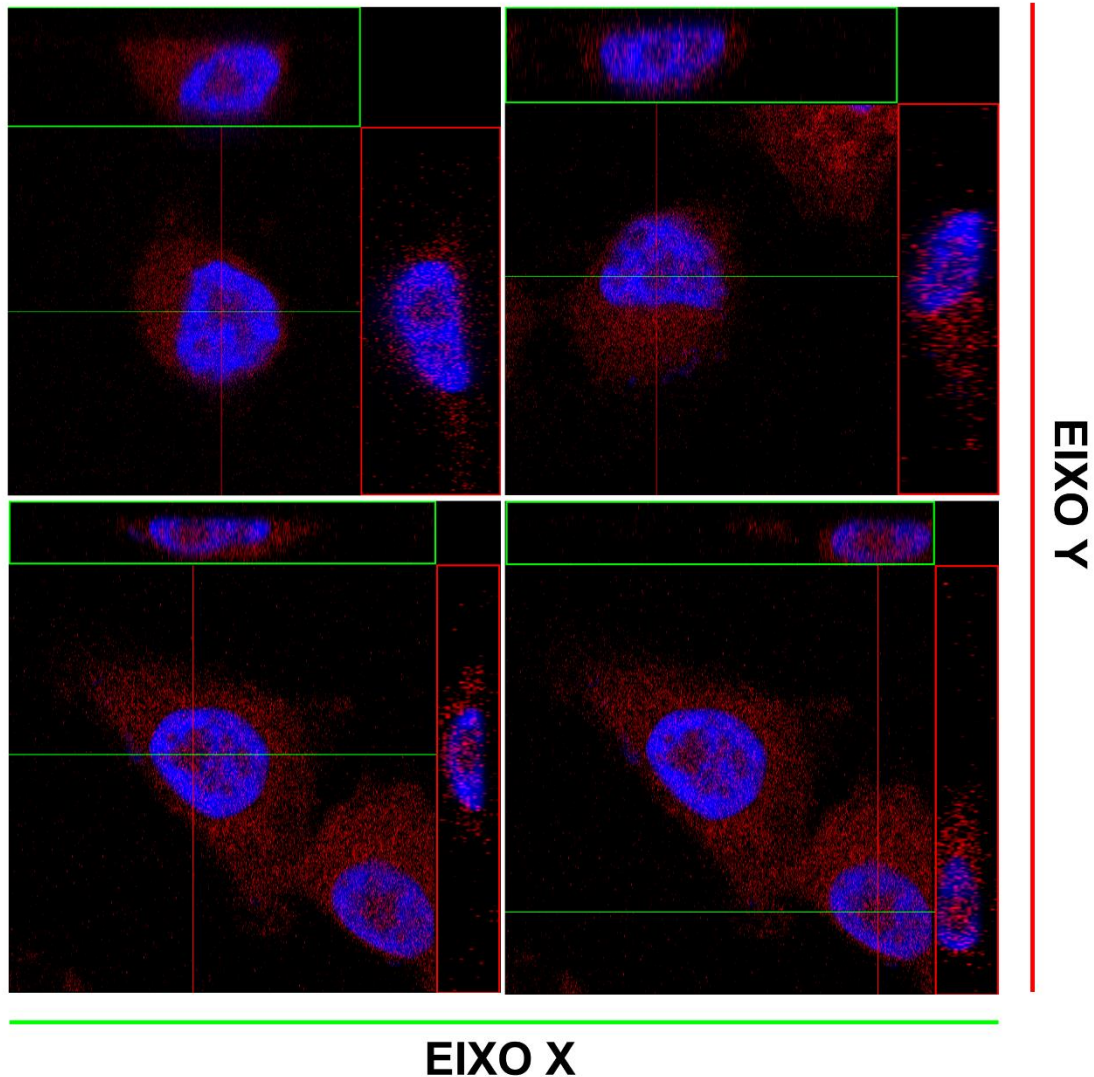


Figura 19 - Os transcritos de RMEL3 estão localizados no citoplasma e núcleo das células A375. Foi realizado a marcação de RMEL3 utilizando sondas de DNA conjugadas com Cy5 (vermelho) que hibridizam na região do éxon 1 e 2 do transcrito RMEL3_201 na linhagem A375. O núcleo das células foi corado com DAPI (Azul). As imagens são do corte ortogonal de um Z-stack, as linhas verdes representam o eixo X do corte, e as vermelhas o eixo Y.

4.3 A expressão de RMEL3 afeta importantes fenótipos tumorais em A375

4.3.1 O silenciamento de RMEL3 prejudica a capacidade clonogênica e proliferação

Afim de avaliar a participação de RMEL3 em características de promoção e manutenção da malignidade do melanoma, foi realizado o silenciamento do RMEL3 por intermédio de shRNA. Foram utilizados dois shRNA diferentes que visam regiões no éxon 2 (shRMEL3 #3) e no éxon 4 (shRMEL3 #4) (Figura 16) do transcrito RMEL3_201. Trabalhos anteriores do laboratório testaram outras sequências de shRNA, entretanto não

obtiveram um silenciamento significativo (Goedert, 2019). Os shRNA foram desenhados antes de conhecermos melhor os transcritos do locus de RMEL3, então avaliamos o nível de silenciamento utilizando dois pares de primer genéricos: RMEL3 All, reconhece dos transcritos 1 ao 8 e o RMEL3 RT, que reconhece os transcritos 1 a 6 (Figura 16).

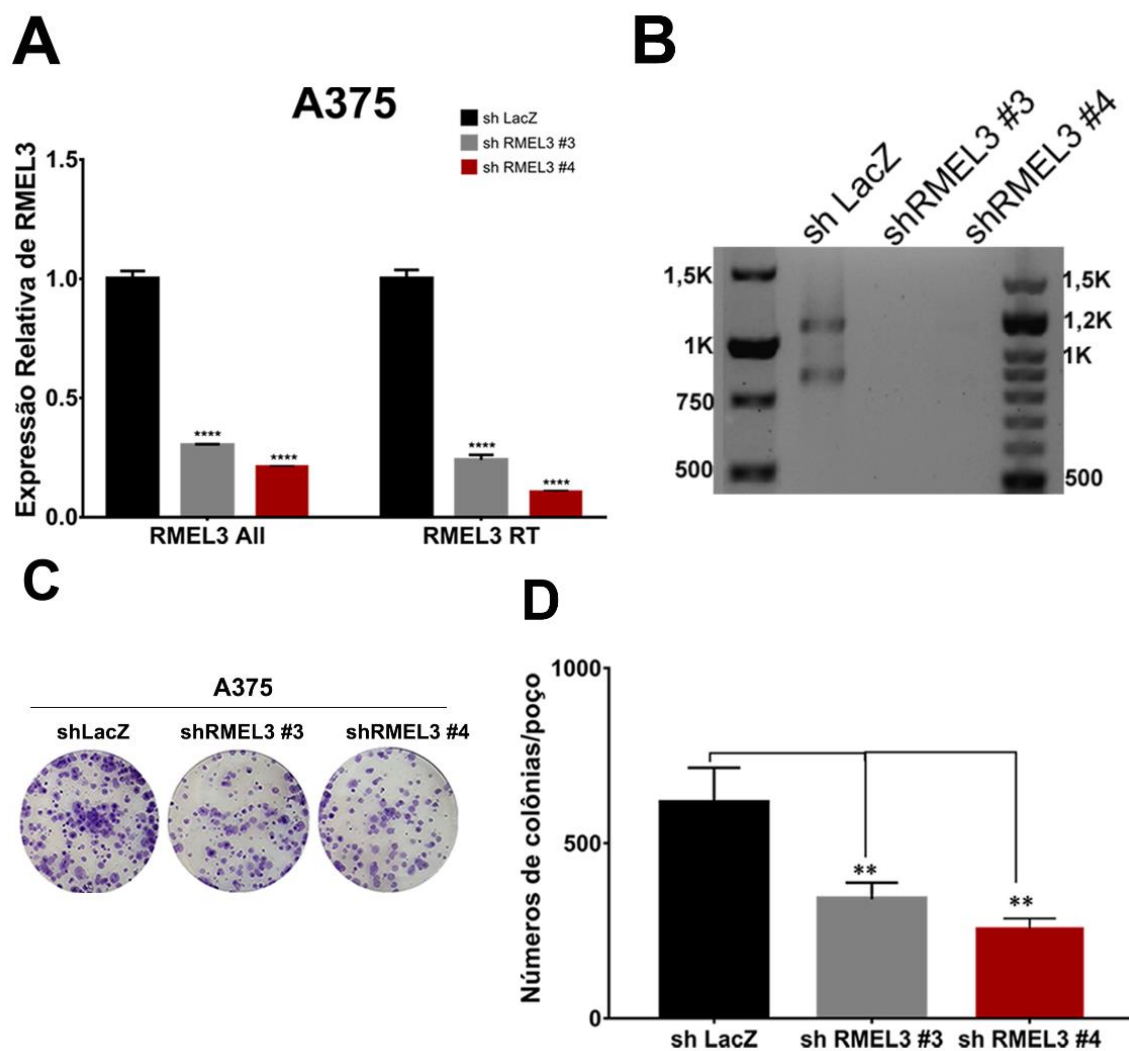


Figura 20 – Nível de silenciamento de RMEL3 promovido pelas shRMEL3 #3 e shRMEL3 #4 nas células A375. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 shRMEL3 #3 e sh RMEL3 #4 e controle (shLacZ) após 48h de indução com 0,5 µg/mL de doxíciclina. Os valores plotados são relativos ao controle sh LacZ. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta C_t}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P < 0,0001. (B) Amplificação do RMEL3 por RT-PCR com par de primers GSP1-RMEL_201. (C) Ensaio clonogênico com A375 shRMEL3 #3 e #4 e controle (shLacZ) (inicial de 500 células). (D) Representação gráfica da contagem de colônias de B. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 réplicas biológicas, ** P < 0,01

O shRMEL3 #4 promoveu um silenciamento drástico dos transcritos de RMEL3, sendo a redução de RMEL3 de mais de 80% quando avaliamos por qRT-PCR nas células expressando o shRMEL3 #4 (Figura 20A). O shRMEL3 #3 teve um silenciamento menor, com eficiência de aproximadamente 70% (Figura 20A). Utilizando esse mesmo cDNA,

realizamos uma PCR com os primers GSP1-RMEL3_201 para avaliar o nível de silenciamento do transcrito canônico e suas variantes com éxon alternativo, e vimos que os dois shRMEL3 promoveram um drástico silenciamento dos transcritos (Figura 20B). Visto que o RMEL3 pode funcionar no melanoma como um regulador positivo das vias de proliferação e sobrevivência MAPK/ERK e PI3K (Goedert et al., 2016), e que promove crescimento independente de mitógenos (Cardoso et al., 2019), avaliamos a capacidade clonogênica e proliferativa das células silenciadas para RMEL3. A capacidade clonogênica das células A375 foi significativamente reduzida após silenciamento de RMEL3, com redução de cerca 60% nas células shRMEL3 #4 e 45% nas células shRMEL3 #3 (Figura 20D-E).

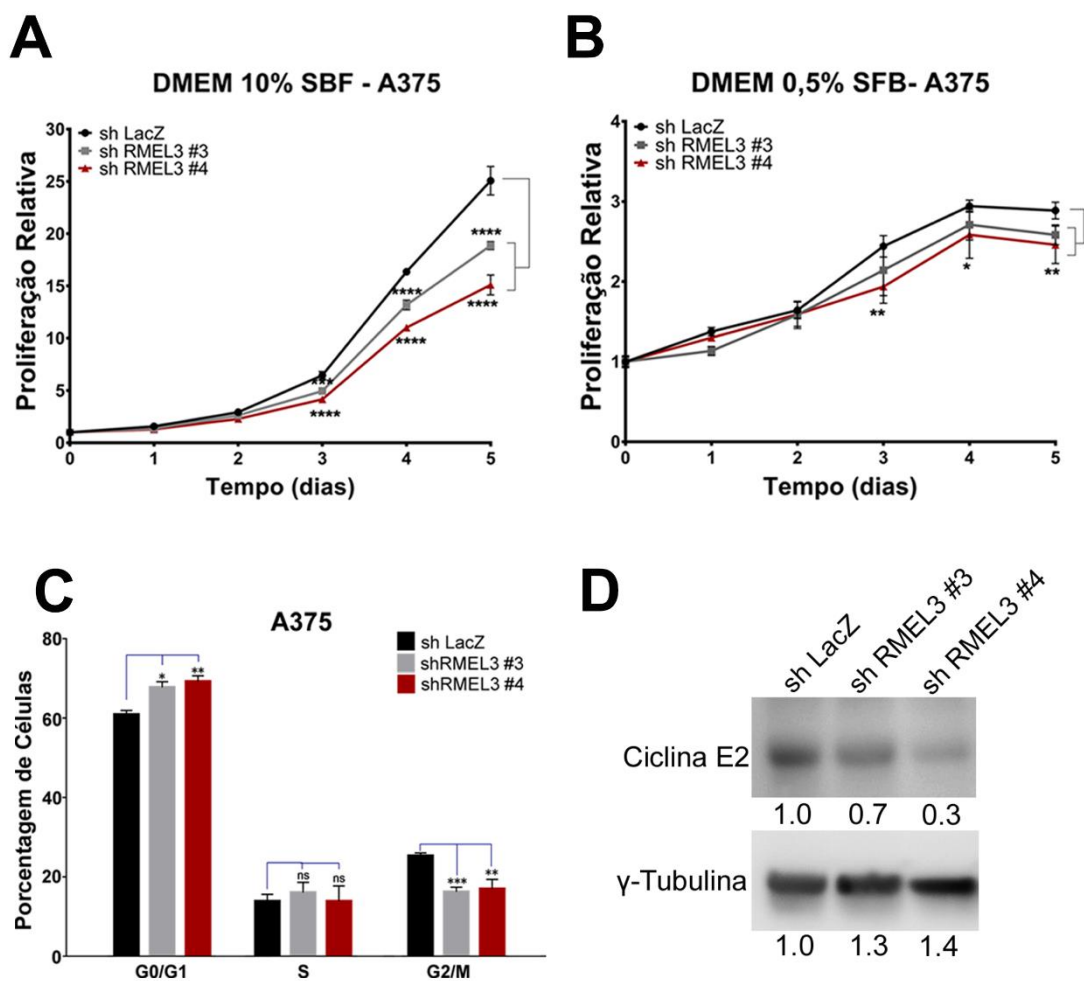


Figura 21 - O silenciamento de RMEL3 reduz capacidade proliferativa e altera ciclo celular em A375. (A) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando shRMEL3 e controle (shLacZ) após cinco dias de indução com 0,5µg/mL de doxiciclina (3000 células iniciais) em condições normais de cultivo com o meio suplementado com 10% de soro fetal. O gráfico representa a média±SEM (n=3). (B) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando shRNAs contra RMEL3 e controle (shLacZ) cinco dias de indução com 0,5µg/mL de doxiciclina (3000 células iniciais) sob condições de cultivo pobre em mitógenos (0,5% SFB). O gráfico representa a média±SEM (n=3). (C) Porcentagem de células A375 shRMEL3 e controle nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, determinada pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA. As células foram induzidas por 48h com 0,5 µg/mL de doxiciclina antes da fixação. O gráfico representa a média ± DP (n=2), (D) Imunodeteccção das proteínas Ciclina E2 e γ-Tubulina nas A375 (linha 1-sh LacZ; linha 2-sh RMEL3 #3; linha 3-sh RMEL3 #4). A quantificação

densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle sh LacZ são mostradas abaixo das bandas. **** P < 0,0001; *** P < 0,001, ** P < 0,01, *P < 0,1 e ns: não significativo.

O silenciamento de RMEL3 reduziu a proliferação nas condições normais de cultivo (DMEM 10% SFB) na presença de mitógenos (Figura 21A) e reduziu drasticamente a proliferação em condição de escassez de fatores de crescimento (DMEM 0,5% SFB) (Figura 21B) a partir de 3 dias em ambas condições. Quando verificamos o ciclo celular da população de células estudadas, observamos que nas A375 silenciadas para RMEL3 há mais células em G0/G1 do que comparadas ao controle e uma considerável redução de células em G2/M, o que sugere que pode estar havendo um atraso no ciclo celular das células (Figura 21C). Checamos os níveis de ciclina E2, ciclina que atua na transição de G1 para S, e observamos uma redução nos níveis proteicos de ciclina E2 nas células shRMEL3 quando comparadas ao controle (Figura 21D), o que explicaria o aumento de células em G0/G1 nas células silenciadas para RMEL3.

Realizamos alguns experimentos com a superexpressão do transcrito RMEL3_201 induzida por doxíciclina nas células A375 transduzidas com pLENTI-RMEL3. Nas células A375 pLENTI-RMEL3, houve um aumento de 80 vezes na expressão de RMEL3_201 quando comparado ao controle pLENTI quando analisamos com o par de primer RMEL3 All e mais de 100 vezes com par de primer RMEL3 RT (Figura 22A). No ensaio clonogênico foi observado um padrão inverso foi observado nas células superexpressoras de RMEL3 quando comparado as células shRMEL3, sugerindo uma melhor capacidade de sobrevivência quando a aumentada a expressão deste lncRNA aumenta (Figura 22 B-C).

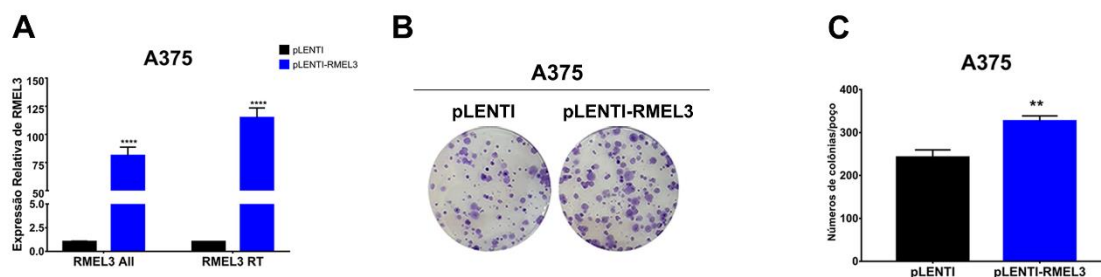


Figura 22 - A superexpressão de RMEL3_201 aumenta capacidade clonogênica da A375. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) após 48h de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina. Os valores plotados são relativos ao controle. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (B) Ensaio clonogênico com A375 pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) (inicial de 300 células). (C) Representação gráfica da contagem de colônias de E. O gráfico representa a média \pm SEM de 3 réplicas biológicas. **** P < 0,0001; ** P < 0,01.

Só foi possível observar diferença na taxa de proliferação das células pLENTI-RMEL3 quando reduzimos as condições de SFB, nessas condições as células superexpressando RMEL3 tiveram maiores taxas de proliferação quando comparadas às células controle (Figura 23A-B). Quando verificamos o ciclo celular dessas células, observamos uma redução de células em G0/G1 e um aumento considerável de células em S (Figura 23C), condizente com o aumento dos níveis de ciclina E2 (Figura 23D).

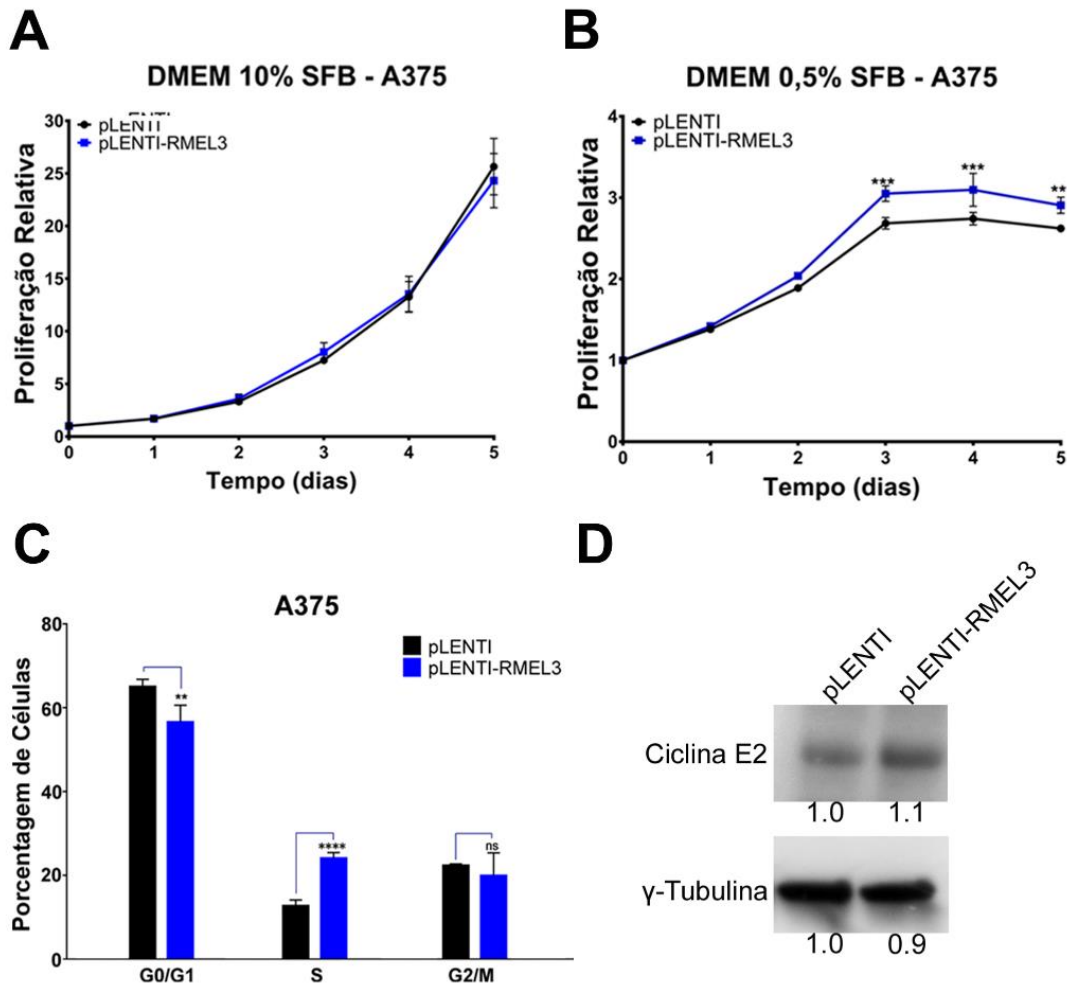


Figura 23 - Superexpressão de RMEL3 aumenta a proliferação em condições de pouco nutriente. (A) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) após cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina (3000 células iniciais) cultivadas em meio suplementado com 10% SFB. (B) A proliferação relativa de células de melanoma A375 expressando pLENTI-RMEL3 e controle após cinco dias de indução com 0,5 μ g/mL de doxíciclina cultivadas com meio pobre em mitogênicos suplementado com 0,5% SFB. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3). (C) Porcentagem de células A375 pLENTI-RMEL3 e controle nas fases G1, S e G2/M do ciclo celular, determinada pela análise por citometria de fluxo do conteúdo de DNA. As células foram induzidas por 48h com 0,5 μ g/mL de doxíciclina antes da fixação. O gráfico representa a média \pm DP (n=2), (D) Imunodeteção das proteínas Ciclina E2 e γ -Tubulina nas A375 (linha 1- pLENTI; linha 2- pLENTI-RMEL3). A quantificação densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle pLENTI são mostradas abaixo das bandas. ****P < 0,0001; ***P < 0,001, ** P < 0,01 e ns: não significativo.

4.3.2 A fosforilação de ERK1/2 e AKT, proteínas efetoras das vias de MAPK e PI3K reduz com o silenciamento de RMEL3

Visto que o silenciamento de RMEL3 reduz a capacidade de sobrevivência e proliferação, analisamos como está a ativação das duas principais vias de proliferação e sobrevivência em melanoma, as vias de MAPK e PI3K. As células shRMEL3 e a shLacZ foram primeiramente cultivadas em meio DMEM na ausência de mitógenos por 72h, afim de reduzir a ativação das vias MAPK e PI3K. Após este tempo de privação, as células foram estimuladas com DMEM 10% SFB nos tempos de 5, 10, 15, 30 e 60 minutos e depois foi avaliado a porcentagem de fosforilação das proteínas ERK1/2 e AKT, proteínas efetoras das vias de MAPK e PI3K, respectivamente.

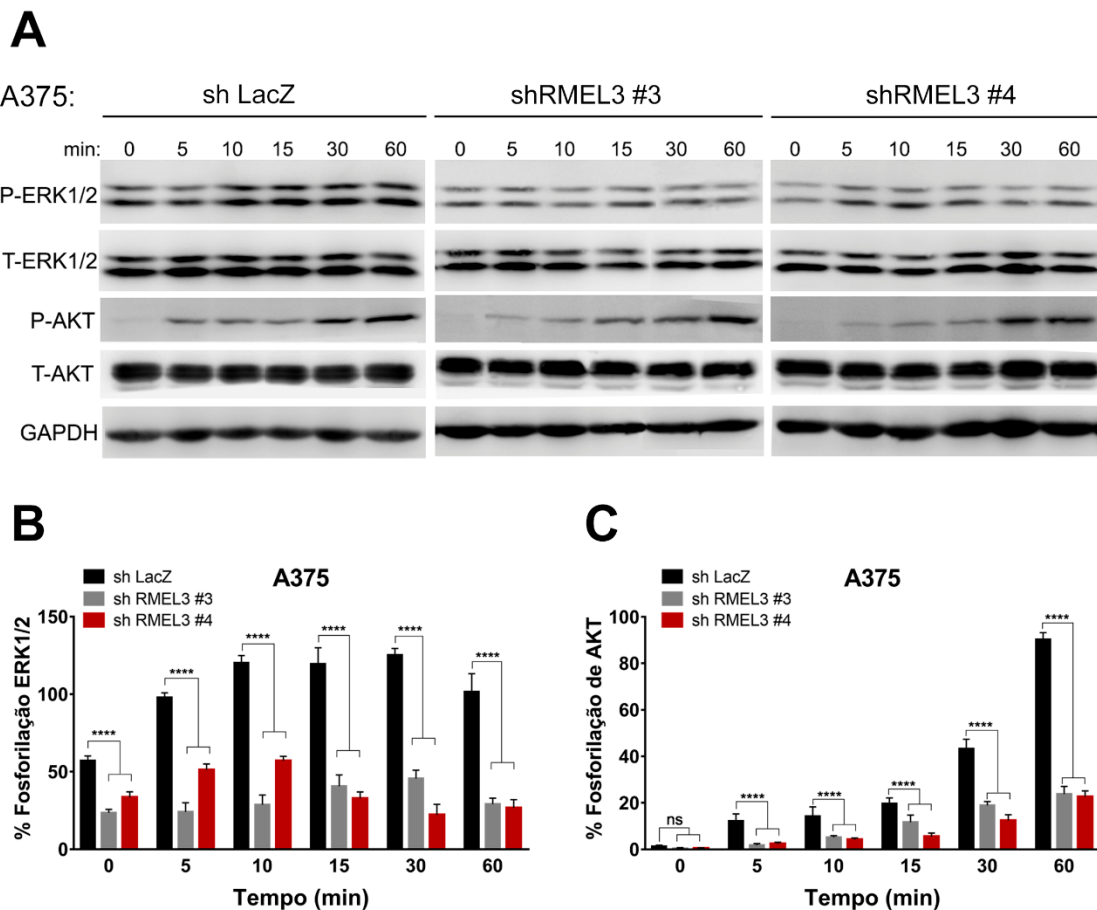


Figura 24 - Redução das proteínas efetoras ERK1/2 e AKT após o silenciamento de RMEL3. As células A375 shRMEL3 e controle foram privadas de mitógenos do SFB por 72h, e depois foram estimuladas com DMEM 10% SFB e lisadas para avaliação dos níveis proteicos por western blot. (A) Imagem representativa dos Western blots contendo células de lisado total A375 sh LacZ, RMEL3 #3 e RMEL3 #4 obtidas após 0, 5, 10, 15, 30 e 60 minutos após estímulo com DMEM 10% SFB marcadas com anticorpos contra ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2); ERK1/2 total (t-ERK1/2); AKT fosforiladas (p-AKT), AKT total (t-AKT) e GAPDH (usado como normalizador de carga proteica). (B) Representação gráfica da porcentagem de fosforilação de ERK1/2 mostrada em A. O gráfico representa a média±SEM (n=3), **** P < 0,0001. (C) Representação gráfica da porcentagem de fosforilação da AKT mostrada em A. O gráfico representa a média±SEM (n=3), **** P < 0,0001. As porcentagens de fosforilação foram calculadas da seguinte

maneira: (densiometria proteína fosforilada/densiometria proteína total)*100. As densiometrias das proteínas de interesse foram normalizadas com a densiometria do GAPDH antes.

No tempo 0 min, observamos que a fosforilação de ERK1/2 não reduz completamente com a privação de mitógenos sofrida pelas células antes do estímulo, o que era de se esperar pois a linhagem A375 possui a mutação BRAF^{V600E} que ativa a via de MAPK independente de estímulo. Entretanto, há uma redução significativa na fosforilação de ERK1/2 nas células silenciadas para RMEL3 após o processo de privação (Figura 24A-B). Após o estímulo, a fosforilação de ERK1/2 aumenta gradativamente atingindo a máxima porcentagem de fosforilação nos tempos de 10,15 e 30 min nas células shLacZ. Já nas células silenciadas para RMEL3, o observado foi que o nível de fosforilação é menor e não atinge o percentual da célula controle em todos os tempos estudados (Figura 24A). Também é possível perceber que o pico de fosforilação de ERK1/2 nestas células é diferente, sendo o maior nível na shRMEL3 #3 no tempo de 30 min, e na shRMEL3 #4 foi no tempo de 10 min, mas rapidamente é reduzido, não se estendendo por muito tempo (Figura 24B).

A fosforilação de AKT também foi altamente comprometida após o silenciamento de RMEL3. Ao contrário do que ocorreu com ERK1/2, a AKT não apresenta nenhuma fosforilação durante a privação de mitógenos, representado pelo tempo 0 (Figura 24A). A fosforilação de AKT é gradativa, aumentando com o passar do tempo de estímulo nas células sh LacZ e nas shRMEL3, entretanto o nível de fosforilação nas células silenciadas não atinge nem 50% do nível da célula controle (Figura 24C). A redução da ativação de AKT é maior nas células shRMEL3 #4, que possui maior eficiência de silenciamento.

4.3.3 O silenciamento de RMEL3 aumenta a morte celular em A375

A redução da proliferação significativa das células silenciadas para RMEL3 despertou o questionamento se estas células estavam somente proliferando menos ou se também estavam morrendo. Realizamos o ensaio de morte celular por marcação de Anexina-V e Iodeto de propídio nas células A375 shRMEL3 cultivadas nos tempos de 24h, 48h e 72h tanto em condições normais de cultivo (DMEM 10%SFB) quanto em privação de soro fetal bovino (DMEM 0%SFB). Nas células A375 shRMEL3 #4, que possui o maior nível de silenciamento, teve um aumento considerável na quantidade de células apoptótica em todos os tempos de cultivo em 10% SFB (Figura 25), acompanhado de uma redução na quantidade de células vivas desde 24 horas de análise (Figura 25A).

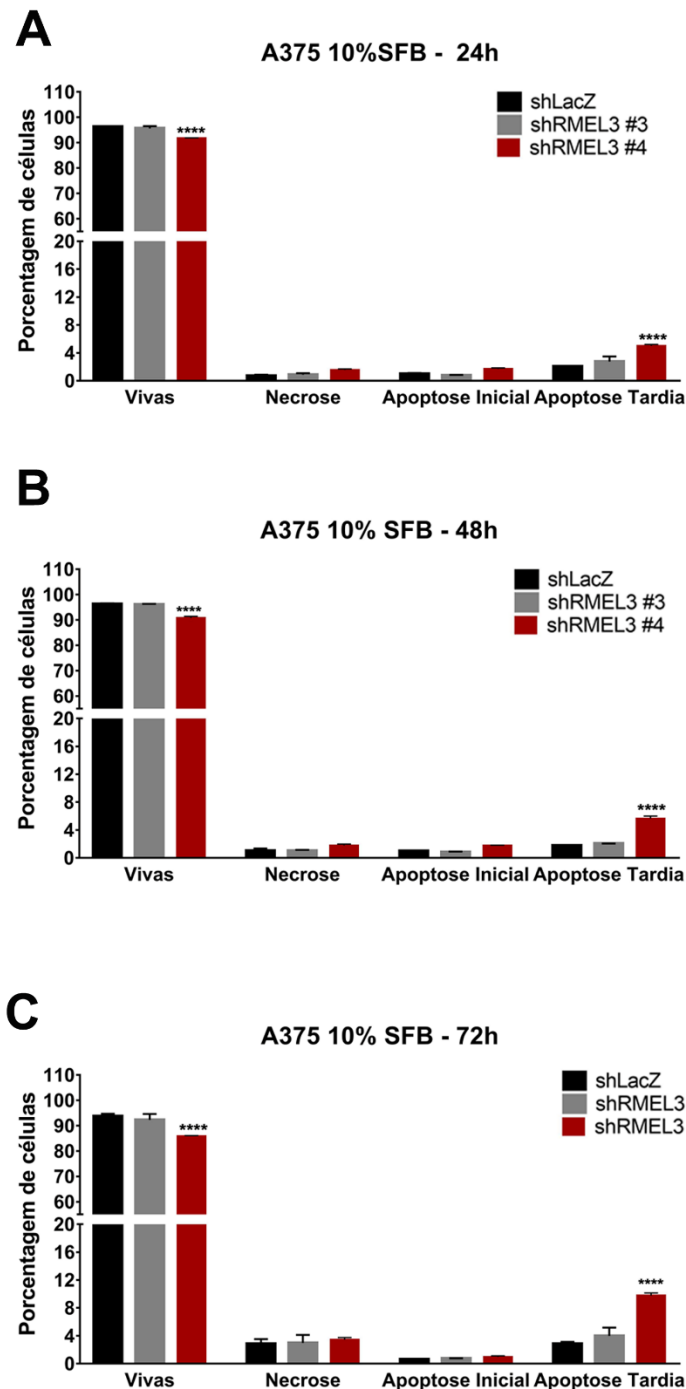


Figura 25 - O silenciamento de RMEL3 aumenta a apoptose em células de melanoma A375. As células A375 sh LacZ e shRMEL3 foram cultivadas em meio de cultura suplementado com 10%SFB nos tempos de 24,48 e 72 horas e então foram analisadas por citometria de fluxo para marcação de Anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio (PI). (A-C) Representação gráfica dos perfis de morte celular das células A375 cultivadas com 10%SFB nos tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Os gráficos representam a média \pm DP (n=2), **** P < 0,0001.

No tempo de 72h, a porcentagem de células apoptóticas na A375 shRMEL3 #4 é superior a 10% enquanto nas células controle não passa de 3% (Figura 25C). Quando avaliamos os níveis proteicos das proteínas apoptóticas caspase-3 e os níveis de PARP

clivada nesse tempo de cultivo específico, vemos um aumento dessas proteínas condizendo com o aumento de apoptose das células silenciadas (Figura 26). Mesmo na população de A375 shRMEL3 #3 que não teve o mesmo nível de apoptose tanto quando a A375 shRMEL3 #4, os níveis das proteínas apoptóticas aumentaram. A proteína anti-apoptótica BCL2 possuem níveis reduzidos nas duas células silenciadas para RMEL3, indicando uma reversão do perfil anti-apoptótico nessas células de melanoma (Figura 26).

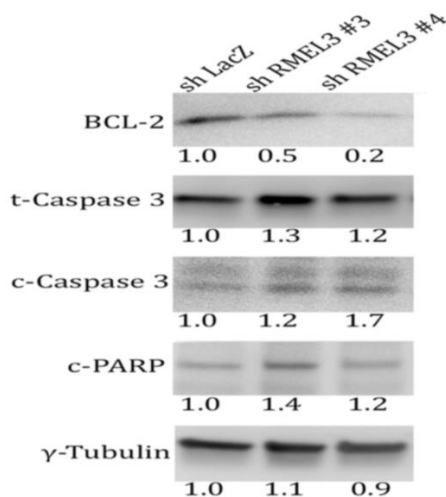


Figura 26 – As células A375 silenciadas para RMEL3 possuem perfil pró-apoptótico. Imunodeteção das proteínas BCL2, caspase 3 total, caspase 3 clivada, PARP clivada e γ -Tubulina nas A375 (linha 1- pLENTI; linha 2- pLENTI-RMEL3). A quantificação densitométrica das proteínas normalizadas pela γ -Tubulina e relativas ao controle sh LacZ são mostradas abaixo das bandas.

A privação de soro fetal bovino juntamente com o silenciamento RMEL3 aumento ainda mais a apoptose das células A375 em todos os tempos analisado (Figura 27). Isso ocorreu tanto nas células com maior nível de silenciamento (shRMEL3 #4) quanto nas células com menos nível de silenciamento (shRMEL3 #3). A redução de células viáveis nas células shRMEL3 foi observada já no tempo de 24 horas (Figura 27A). A célula controle não mostrou um aumento considerável de morte celular mediante privação de soro quando comparado a condição com 10% SFB em todos os tempos analisados. A quantidade de células necróticas foi maior nas células A375 shRMEL3 #4 quando comparadas à controle quando privada de soro (Figura 27).

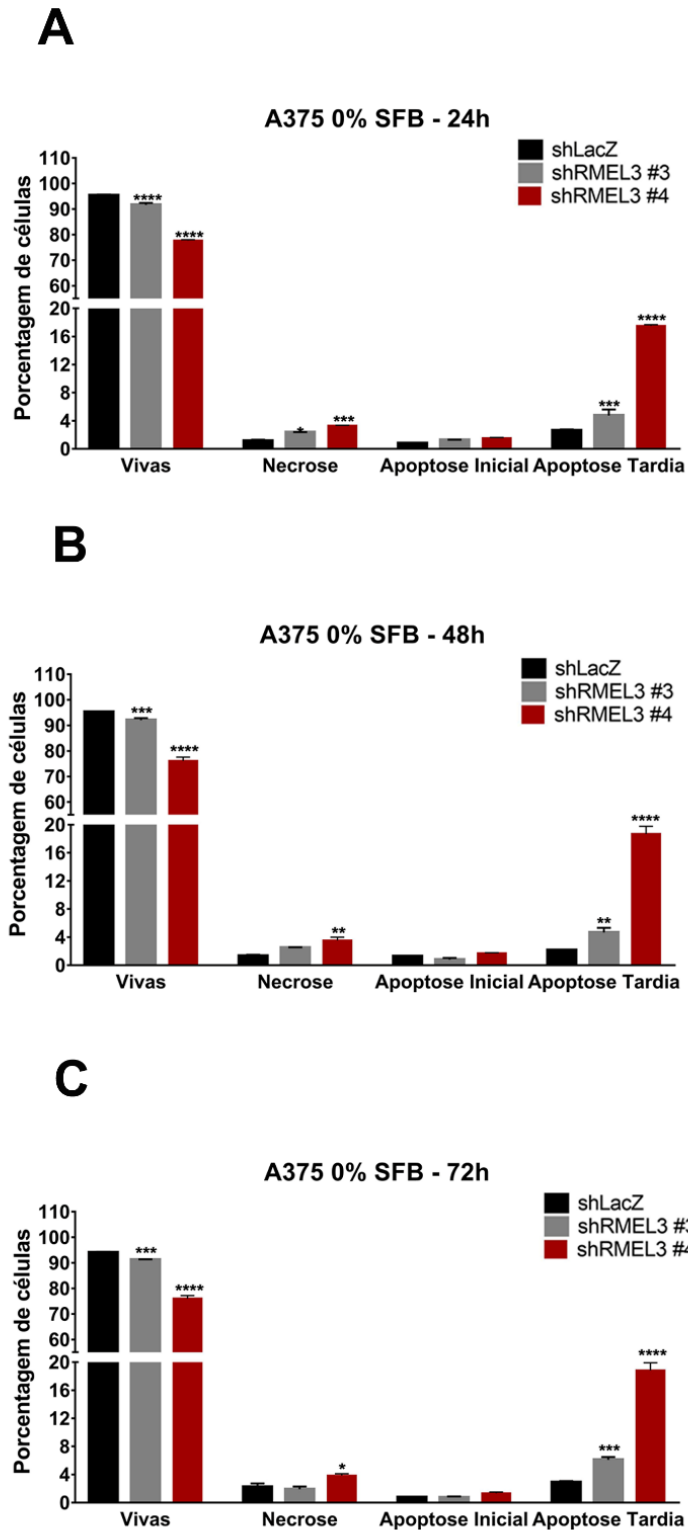


Figura 27 - O silenciamento de RMEL3 juntamente com a privação de soro aumenta a apoptose em células de melanoma A375. As células A375 sh LacZ e shRMEL3 foram cultivadas em meio de cultura sem soro fetal bovino (0%SFB) nos tempos de 24,48 e 72 horas e então foram analisadas por citometria de fluxo para marcação de Anexina-V conjugada com FITC e iodeto de propídio (PI). (A-C) Representação gráfica dos perfis de morte celular das células A375 cultivadas com 0% SFB nos tempos de 24, 48 e 72h, respectivamente. Os gráficos representam a média \pm DP (n=2), **** P< 0,0001.

4.3.4 A ausência de RMEL3 nas células A375 afeta a captação de glicose e aumenta o lactato intracelular

Outro importante fenótipo tumoral é a reprogramação do metabolismo celular, então afim de avaliar se o RMEL3 teria alguma influência sobre o metabolismo das células A375, realizamos uma quantificação da captação de glicose, secreção de lactato e lactato intracelular. As células A375 shLacZ e as shRMEL3 foram cultivadas com meio contendo soro (10% SFB) e na ausência de soro por 48 horas e depois foram realizadas as medições desejadas. O que vimos nas células silenciadas foi uma redução na captação de glicose, mais acentuada nas células shRMEL3 #4 quando as células são cultivadas na presença de soro fetal bovino, e uma tendência a ter também uma menor captação quando cultivadas na ausência de soro (Figura 28A). Juntamente, foi observado que a secreção de lactato no meio extracelular foi significativamente menor nas células A375 shRMEL3 #4 quando comparado a controle (Figura 28B). Curiosamente, a quantidade de lactato intracelular está aumentada nas células silenciadas para RMEL3 quando comparadas à controle, tanto quando cultivadas na presença de soro fetal bovino (10%) quanto na ausência de soro (Figura 27C).

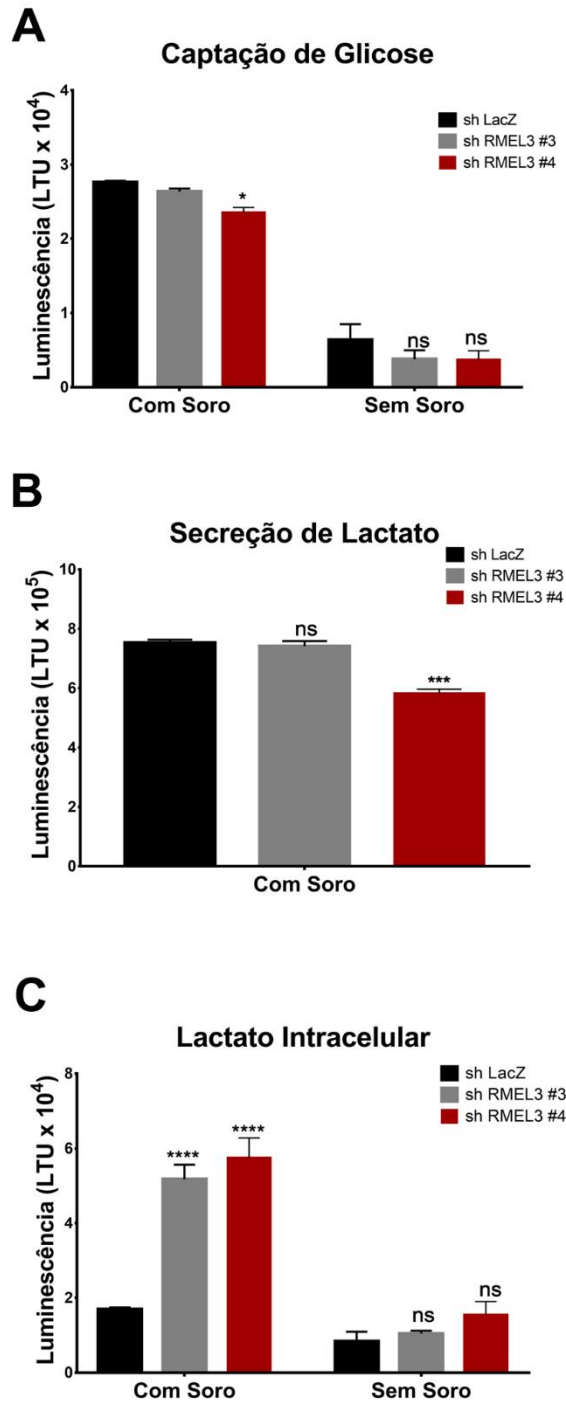


Figura 28 - O silenciamento de RMEL3 muda os níveis de captação de glicose nas células A375. (A) Quantificação da captação de glicose nas células A375 shRMEL3 e controle nas condições de cultivo com 10% SFB (Com Soro) e em condição de privação (Sem Soro). (B) Quantificação da secreção de lactato das células A375 shRMEL3 e controle nas condições normais de cultivo (10% SFB). (C). Quantificação do lactato intracelular das células A375 sh RMEL3 e controle condições de cultivo com 10% SFB (Com Soro) e em condição de privação (Sem Soro). Os gráficos representam a média \pm SEM (n=3), **** P < 0,0001, *** P < 0,001, *P < 0,1.

4.3.5 O silenciamento de RMEL3 reduz a capacidade migratória e invasiva das células A375

A capacidade migratória e invasiva são fenótipos cruciais da metástase. Estudos anteriores do grupo, correlacionaram a expressão elevada de RMEL3 em melanomas subcutâneos e fenotipicamente invasivos, de acordo com amostras disponíveis no TCGA (Goedert, 2019). Afim de avaliar estes fenótipos, realizamos dois ensaios utilizando insertos com membrana com poros de 0,8 μm para mimetizar uma migração, e os insertos revestidos de uma fina camada de matrigel, simulando a membrana basal para avaliar a invasão. Os resultados destes ensaios indicam que o silenciamento de RMEL3 reduz drasticamente a capacidade migratória (Figura 27A), sendo a redução nas células A375 shRMEL #3 de mais de 50% e nas células shRMEL3 #4 de mais de 80% (Figura 27C). A invasão também foi fortemente reduzida nas células silenciadas quando comparadas ao controle (Figura 27B), não havendo muita diferença entre as duas células silenciadas. Ambas tiveram aproximadamente 80% de redução na quantidade de células que invadiram a camada de matrigel e passaram pelos poros do inserto (Figura 27D).

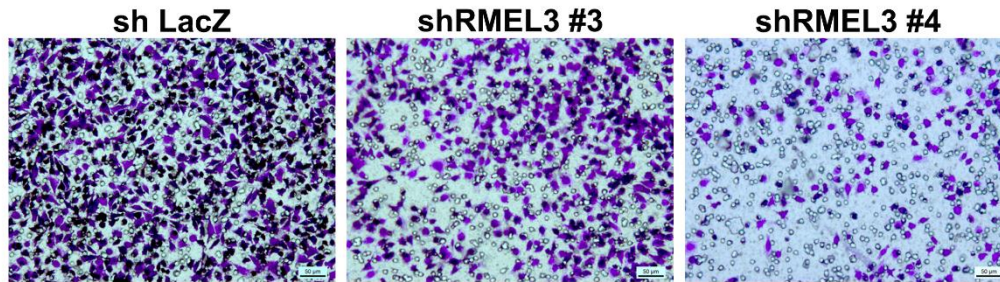
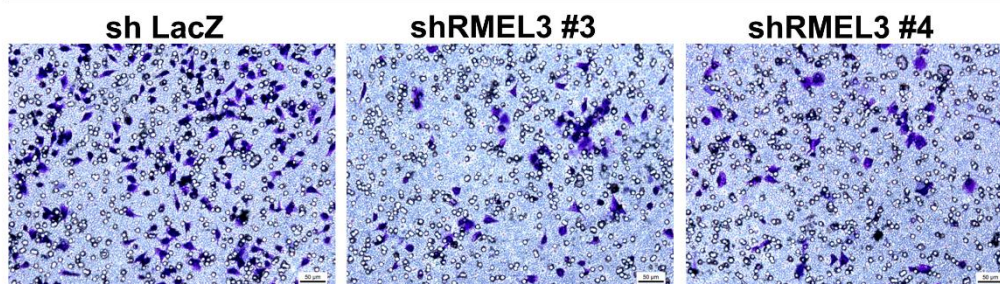
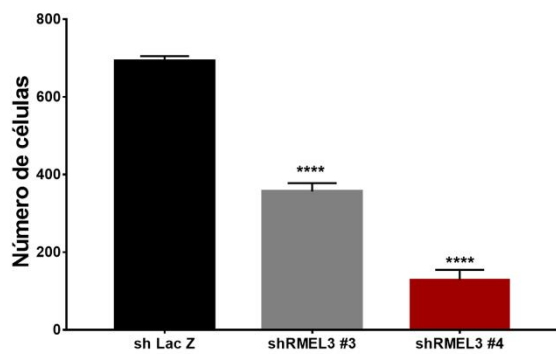
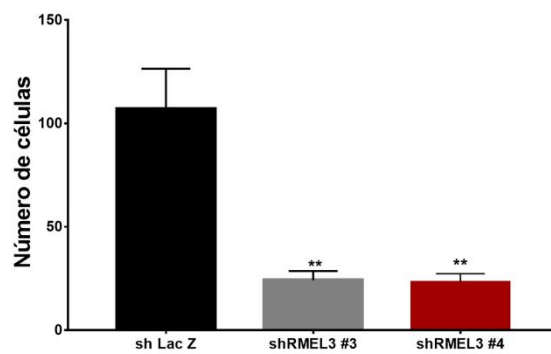
A**Migração - A375****B****Invasão - A375****C****Migração - A375****D****Invasão - A375**

Figura 29 - Ausência de RMEL3 reduz migração e invasão nas células A375. As células A375 shRMEL3 e controle foram privadas de soro por 72h, depois foram desaderidas e plaquedas (1×10^5 células/inserto) em meio simples nos insertos transwell encaixados nos poços com DMEM 10%SFB ao fundo. Após 20h de incubação a 37°C, as células na superfície inferior da membrana foram fixadas, coradas com cristal violeta fotografadas com o auxílio de uma câmera acoplada ao microscópio de luz invertido na magnificação de 20X (A) Imagens representativas das células A375 shLacZ e shRMEL3 que migraram pela membrana do inserto transwell. (B) Imagens representativas das células A375 shLacZ e shRMEL3 que invadiram a camada de matrigel e ultrapassaram a membrana do inserto transwell. (C) Quantificação das células que migraram pela membrana. As colunas representam a média das células que migraram/campo \pm SEM (n=3). (D) Quantificação das células que invadiram a camada de matrigel e ultrapassaram pela membrana. As colunas representam a média das células que invadiram/campo \pm SEM (n=3). **** P < 0,0001, ** P < 0,01.

A secreção de metaloproteínas de matriz (MMP) é um processo importante no processo de invasão e metástase, pois estas enzimas degradam a matriz extracelular e a membrana basal, permitindo que as células cancerígenas se espalhem para os órgãos distais. Devido a expressiva redução da invasão e migração das células A375 após o silenciamento de RMEL3, decidimos avaliar a secreção das MMP-2 e MMP-9 no meio de cultivo através do ensaio de zimografia em gelatina. As células A375 shRMEL3 e shLacZ foram cultivadas por 24 horas em meio isento de SFB, e depois esse meio condicionado foi utilizado para avaliar a secreção das MMP-2 e MMP-9 com base na atividade enzimática dessas proteínas. A atividade de MMP-9 foi ligeiramente menor nas células shRMEL3, enquanto a atividade de MMP-2 foi aumentada principalmente nas células silenciadas com o shRMEL3 #4 (Figura 28).

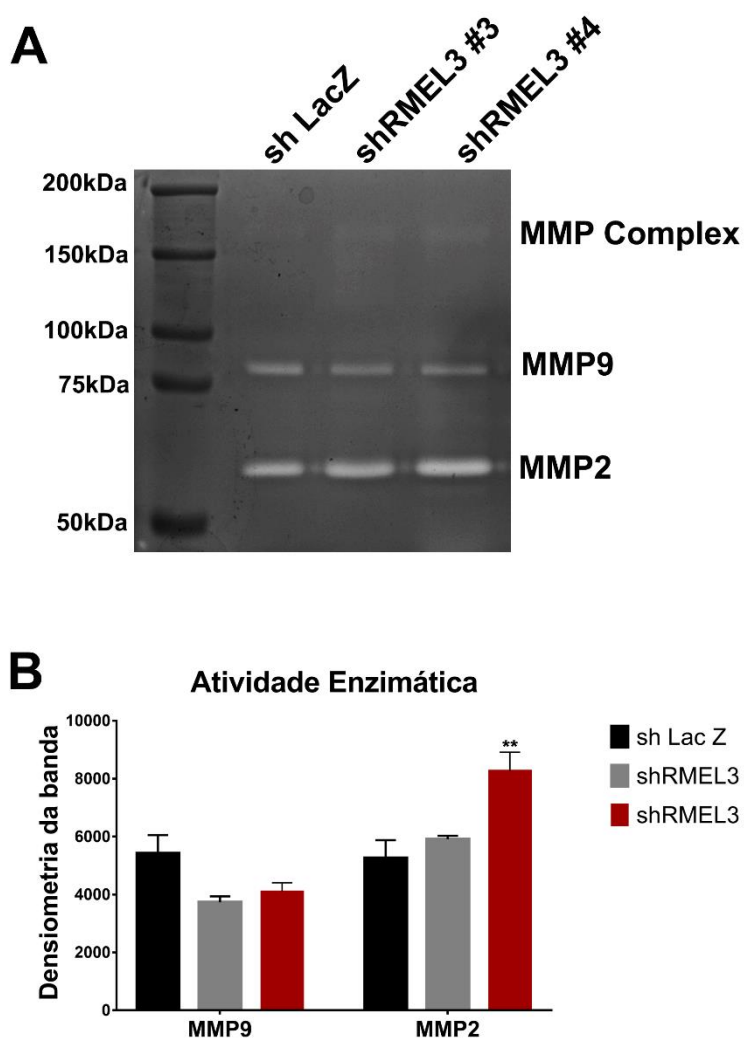


Figura 30 - Efeito do silenciamento de RMEL3 na secreção de metaloproteínas de matriz. As células A375 foram cultivadas em meio simples por 24 horas e depois esse meio foi coletado e realizado o ensaio de zimografia em gelatina. (A) Imagem representativa de um gel SDS com gelatina corado com Comassie Blue após ensaio de zimografia. As bandas brancas são oriundas da atividade enzimática das metaloproteínas de matriz MMP9 (82kDa) e MMP2 (62

kDa). (B) Representação gráfica da densitometria das bandas ocasionadas por MMP9 e MMP2. As colunas representam a média de três sobrenadantes diferentes de cada célula \pm SEM (n=3). ** P< 0,01.

4.4 Validação da interação de RMEL3 com proteínas da via de MAPK e Hippo

4.4.1 RMEL3_201 expresso em HEK293T interage com as proteínas ARAF e MST2

Estudo realizado anteriormente em nosso laboratório identificou 32 proteínas candidatas a ligantes de RMEL3 através do *pulldown* do lncRNA endógeno das células A375, seguido de espectrometria de massas para a identificação dos ligantes (Goedert, 2019). Dentre as proteínas identificadas, três nos chamaram atenção por participarem de processos que suportam tumorigênese em melanoma e estão diretamente relacionados à via MAPK: as proteínas ARAF, MST2/STK3 e FAM83D. As interações entre RMEL3 e as proteínas ligantes foram avaliadas através do ensaio de imunoprecipitação seguidos de RT-PCR para confirmar o enriquecimento de RMEL3 (ensaio de RIP). Primeiramente realizamos esta análise nas células HEK293T, pois não possuem expressão de RMEL3 então era um bom modelo para padronização da técnica. Para isso, realizamos a transdução das células HEK293T com plasmídeo pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) para expressão estável de RMEL3 foi induzida em células HEK293T. Após a confirmação da expressão (Figura 31A), a linhagem celular foi transfectada com pCMV6M-Mst2 para expressão de myc-MST2 ou pHAGE-ARAF para expressão de ARAF. Após 48 horas de expressão, foi realizado o ensaio RIP, como ilustrado na Figura 31B. O enriquecimento de RMEL3 com MST2 foi de $16,33 \pm 1,0$ vezes, e com ARAF $18,86 \pm 0,92$ vezes (Figura 31C).

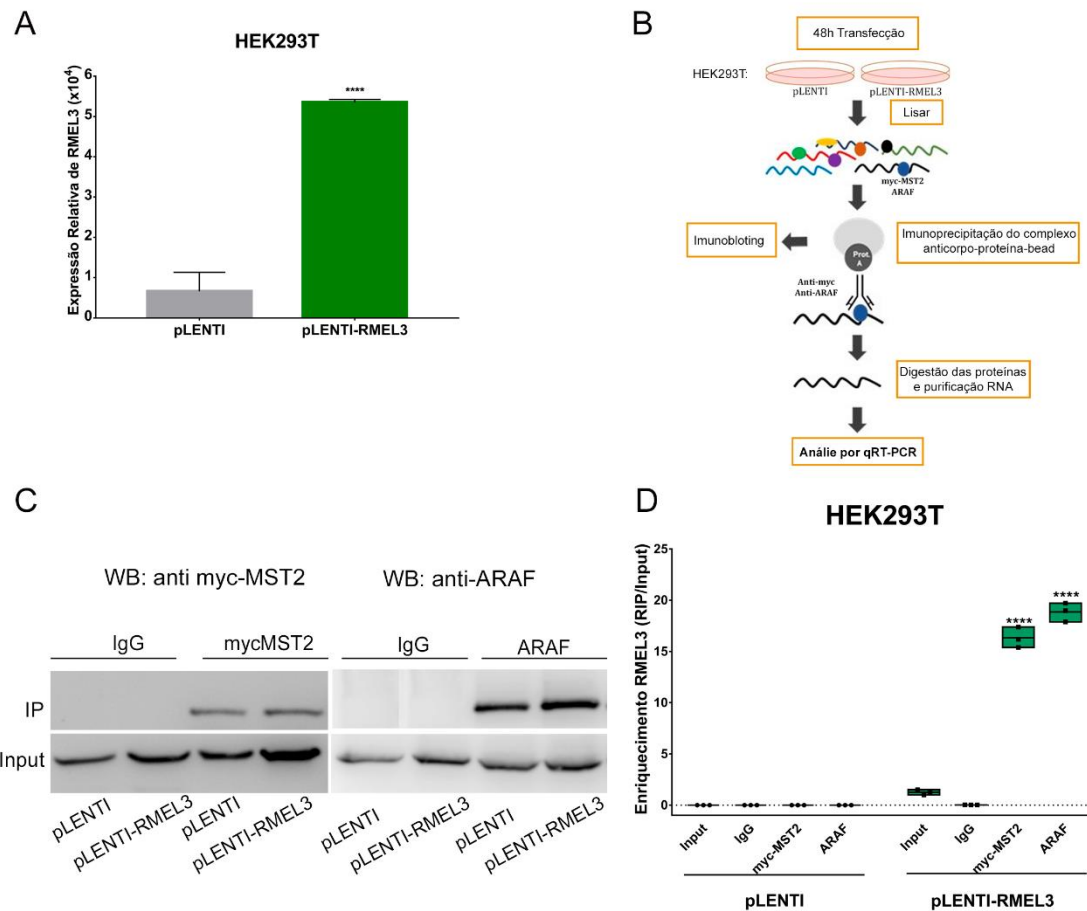


Figura 31 - O RMEL3 é enriquecido em imunoprecipitados de MST2 e ARAF em células HEK293T superexpressando RMEL3_201. (A) Expressão relativa do transcrito RMEL3_201 na linhagem HEK-293T expressando pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI), os valores plotados são relativos ao controle. O gene TBP foi usado como endógeno com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$ para normalizar os níveis de expressão. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P < 0,0001. (B) Resumo esquemático do ensaio de RNA-imunoprecipitação (RIP). (C) Imunoprecipitação (IP) de myc-MST2 e ARAF demonstrada por western blot sondado com anti myc (myc-MST2 – 58 kDa) e anti-ARAF (68 kDa). O controle negativo de IgG foi utilizado em ambas as imunoprecipitações (D) qRT-PCR foi realizado nas amostras para avaliar o enriquecimento do transcrito RMEL3 precipitado pelo anticorpo anti-myc e anti-ARAF sobre o Input. O gráfico representa a média \pm DP (n=3), **** P < 0,0001.

A proteína ARAF além de atuar com uma das quinases RAF na via de MAPK, também é descrita como ligante MST2, suprimindo sua ativação e, assim, promovendo um efeito anti-apoptótico sobre as células tumorais. Para investigar se RMEL3 contribui para a formação deste complexo inibidor, a interação entre MST2 com ARAF foi examinada na presença de lncRNA. Para isso, myc-MST2 foi imunoprecipitado a partir de lisados celulares de HEK293T pLENTI e pLENTI-RMEL3 após a co-transfecção com pCMV6M-Mst2 e pHAGE-ARAF por 48 horas. A eficiência da transfecção varia muito entre as células HEK293T pLENTI e a pLENTI-RMEL3, então para melhor avaliarmos a precipitação das proteínas estudadas, normalizamos a quantidade das proteínas

precipitadas pela quantidade de entrada da IP (Input). Após essa normalização, vemos que os níveis da proteína myc-MST2 imunoprecipitada é levemente menor entre pLENTI e pLENTI-RMEL3, cerca de 10% menos, sendo o enriquecimento de myc-MST2 de $0,93 \pm 0,08$ em pLENTI e $0,83 \pm 0,17$ em pLENTI-RMEL3 (Figura 32A-B). Quando verificamos o nível de ARAF precipitado juntamente com myc-MST2 (co-IP), o enriquecimento de ARAF em pLENTI foi de $0,53 \pm 0,06$ e em pLENTI-RMEL3 foi de $0,70 \pm 0,09$, o que é um aumento de cerca de 30% no nível de proteína co-imunoprecipitada. Não é um aumento significativo, mas nos indica que RMEL3 pode estar contribuindo para essa interação.

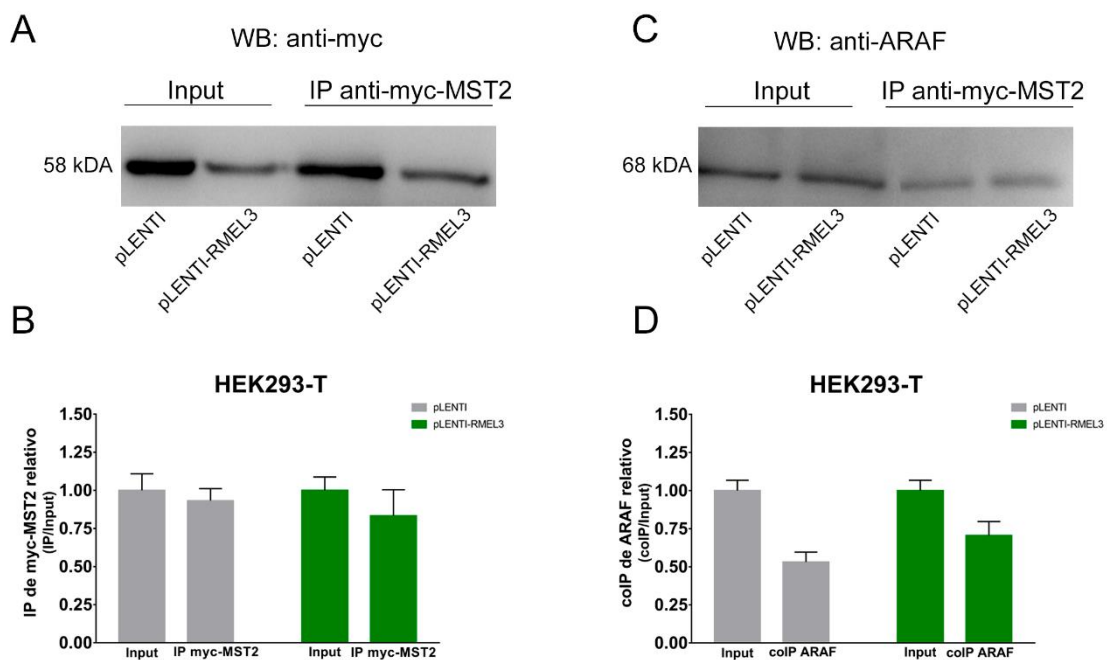


Figura 32 - RMEL3 pode estar contribuindo para o aumento da interação entre MST2 e ARAF. (A) As células HEK-297T pLENTI-RMEL3 e controle (pLENTI) foram transfectadas com pCMV6M-Mst2 (myc-MST2) e pHAGE-ARAF (ARAF) por 48 horas. A proteína myc-MST2 foi imunoprecipitada com anti-myc IgG (9E10) dos lisados do HEK-293T pLENTI-RMEL3 e pLENTI. Myc-MST2 imunoprecipitado foi imunodetectado por western blot com anti-myc. (B) Representação gráfica da quantidade de myc-MST2 relativa ao input mostrado em A. Cada banda da IP anti-myc-MST2 foi normalizada com seu Input (IP/Input). (C) As imunoprecipitados mostradas em A foram imunodetectadas com anti-ARAF para verificar a co-imunoprecipitação de ARAF. (D) Quantificação do nível proteico de ARAF das amostras de co-imunoprecipitados relativo ao input mostrados em C. Cada banda da co-IP anti-ARAF foi normalizada com seu Input (IP/Input). Imagens representativas do Western blot são mostradas. Os dados foram expressos como a média \pm SEM (n=3).

4.4.2 RMEL3 endógeno possui interação com ARAF, MST2 e FAM93D em A375

Após padronizarmos a técnica de RIP e IP das proteínas de interesse, avaliamos como acontece essa interação nas células A375, onde a expressão de RMEL3 é endógena.

Para isso realizamos o RIP das proteínas endógenas de A375 e depois avaliamos o enriquecimento de RMEL3 dos imunoprecipitados. Como mostra a Figura 32A-C, a imunoprecipitação foi eficiente nas três proteínas estudadas. Mensurando o enriquecimento de RMEL3 nos imunoprecipitados obtidos, vemos um enriquecimento de $5,67 \pm 0,90$ em ARAF, $7,08 \pm 0,61$ em MST2 e $24,5 \pm 3,78$ em FAM83D.

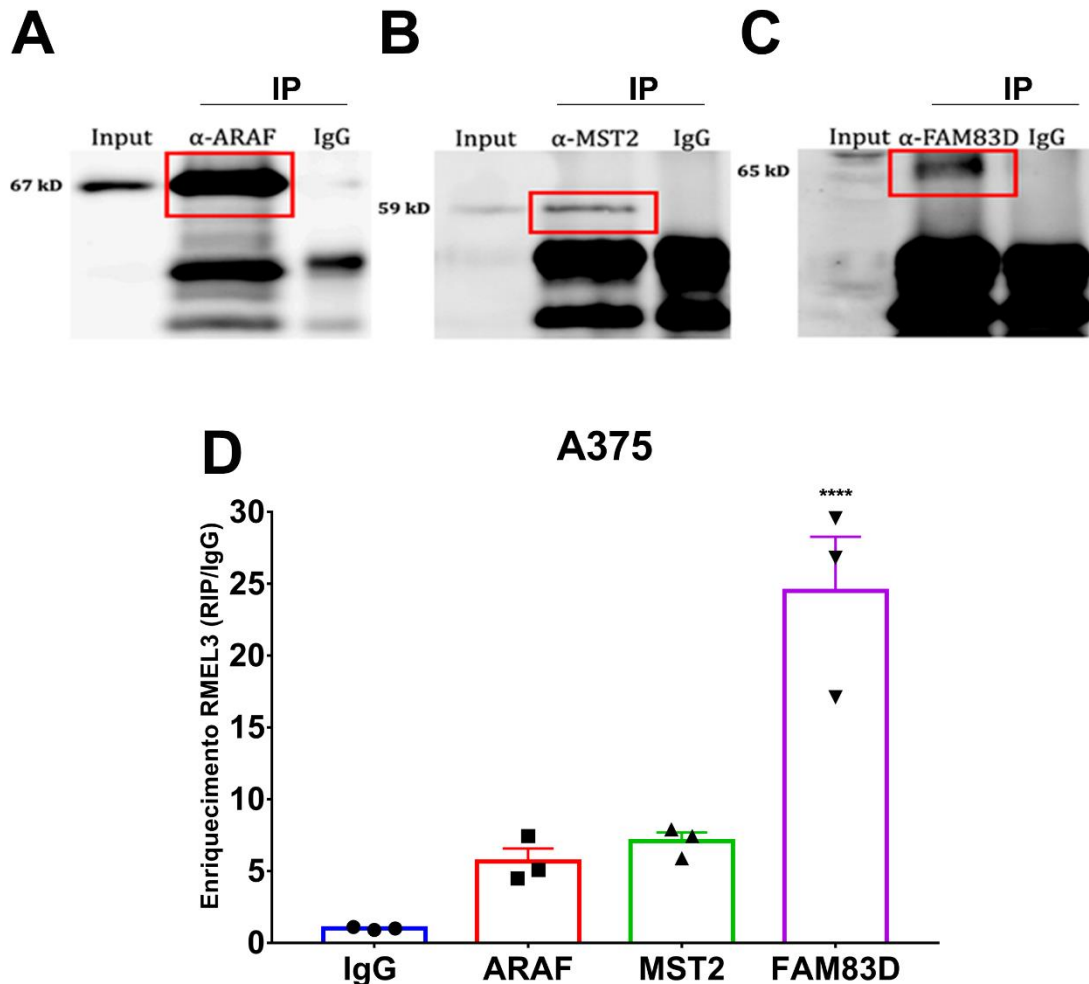


Figura 33 - Interação de RMEL3 com as proteínas ARAF, MST2 e FAM93D em melanoma. (A-C) Imunoprecipitação (IP) de ARAF, MST2 e FAM93D demonstrada por western blot sondado com anti-ARAF (67kDa), anti-MST2 (59kDa) e anti-FAM93D (65 kDa). O controle negativo de IgG foi utilizado em todas as imunoprecipitações. (D) qRT-PCR foi realizado nas amostras para avaliar o enriquecimento do transcrito RMEL3 precipitado nas amostras de A,B e C. O enriquecimento de RMEL3 dos RIPs é relativo ao IgG. O gráfico representa a média \pm DP (n=3).

Realizamos também o *pulldown* de RMEL3 endógeno com sondas de DNA conjugadas com biotina que hibridizam nos éxons 1 e 2 do RMEL3_201, e como controle utilizamos sondas para PCA3, um lncRNA não expresso em melanoma. Houve um enriquecimento de mais de 30% de RMEL3 no pulldown com as sondas para RMEL3 em comparação à 3% com as sondas de PCA3 (Figura 34A). Foi checado o enriquecimento

de SAMMSON, um lncRNA expresso em melanoma, afim de verificar a especificidade das sondas contra RMEL3, e foi detectado somente cerca de 2% de SAMMSON, confirmando assim a especificidade das sondas utilizadas (Figura 34A). Em seguida realizamos um *western blot* com as amostras obtidas por *pull-down* para imunodeteccção das proteínas ARAF, MST2 e FAM83D. Foi possível detectar todas proteínas de interesse nas amostras de pull-down, tendo a FAM83D uma imunomarcação mais forte quando comparada com as demais (Figura 34B).

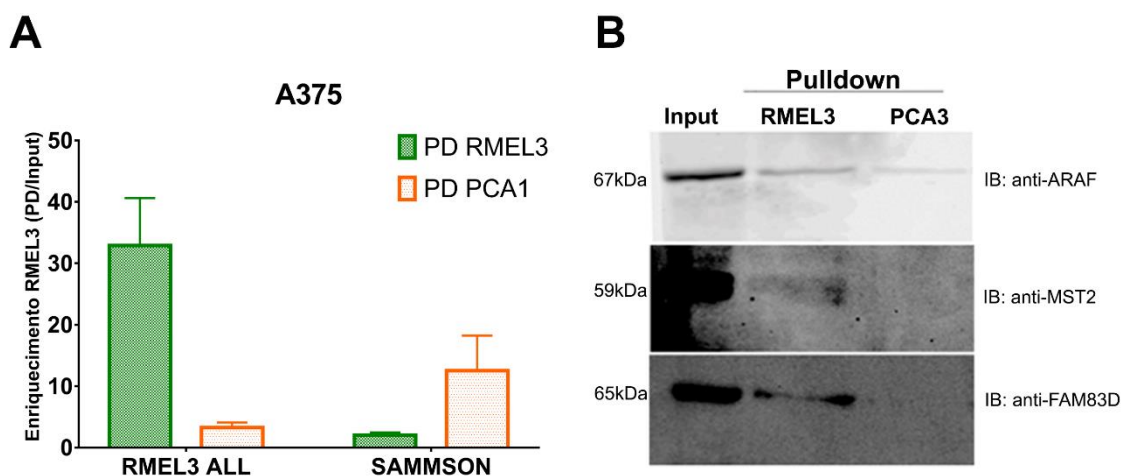


Figura 34 - As proteínas ARAF, MST2 e FAM83D são detectadas no pull-down de RMEL3 endógeno. Experimento de *pull-down* de RNA endógeno utilizando probes que reconhecem o RMEL3, e sondas que reconhecem PCA3 como controle negativo. (A) O gráfico representa a média \pm SEM de 2 replicatas biológicas do enriquecimento de RMEL3 após o pull-down (PD). SAMMSON foram utilizados como controle para aferir a pureza/especificidade do experimento. (B) Imunodeteccção das proteínas de interesse com anti-ARAF (67kDa), anti-MST2 (59kDa) e anti-FAM93D (65 kDa) após *western blot* realizado após o *pull-down*.

Em parceria com o aluno de iniciação científica do laboratório Vitor Merino, buscamos identificar *in silico* através de um algoritmo bioinformático de predição de interação RNA-proteína as possíveis regiões do RMEL3 responsáveis pela interação nas proteínas ARAF, MST2 e FAM83D. Para isso, utilizamos o software gratuito catRAPID que estima com grande acurácia a propensão de interação entre proteínas e RNAs por meio da combinação dos parâmetros de estrutura secundária, ligações de hidrogênio e forças de van der Waals. Com intuito de identificar qual seria a região do RMEL3_201 canônico de A375 (T-A375_1 – Figura 16) mais propensa a interagir com as proteínas estudadas, utilizamos a ferramenta “*catRAPID fragments*”, que divide a sequência polipeptídica de uma proteína e nucleotídica do RNA em fragmentos para analisar a predição de interação individual de cada um desses fragmentos.

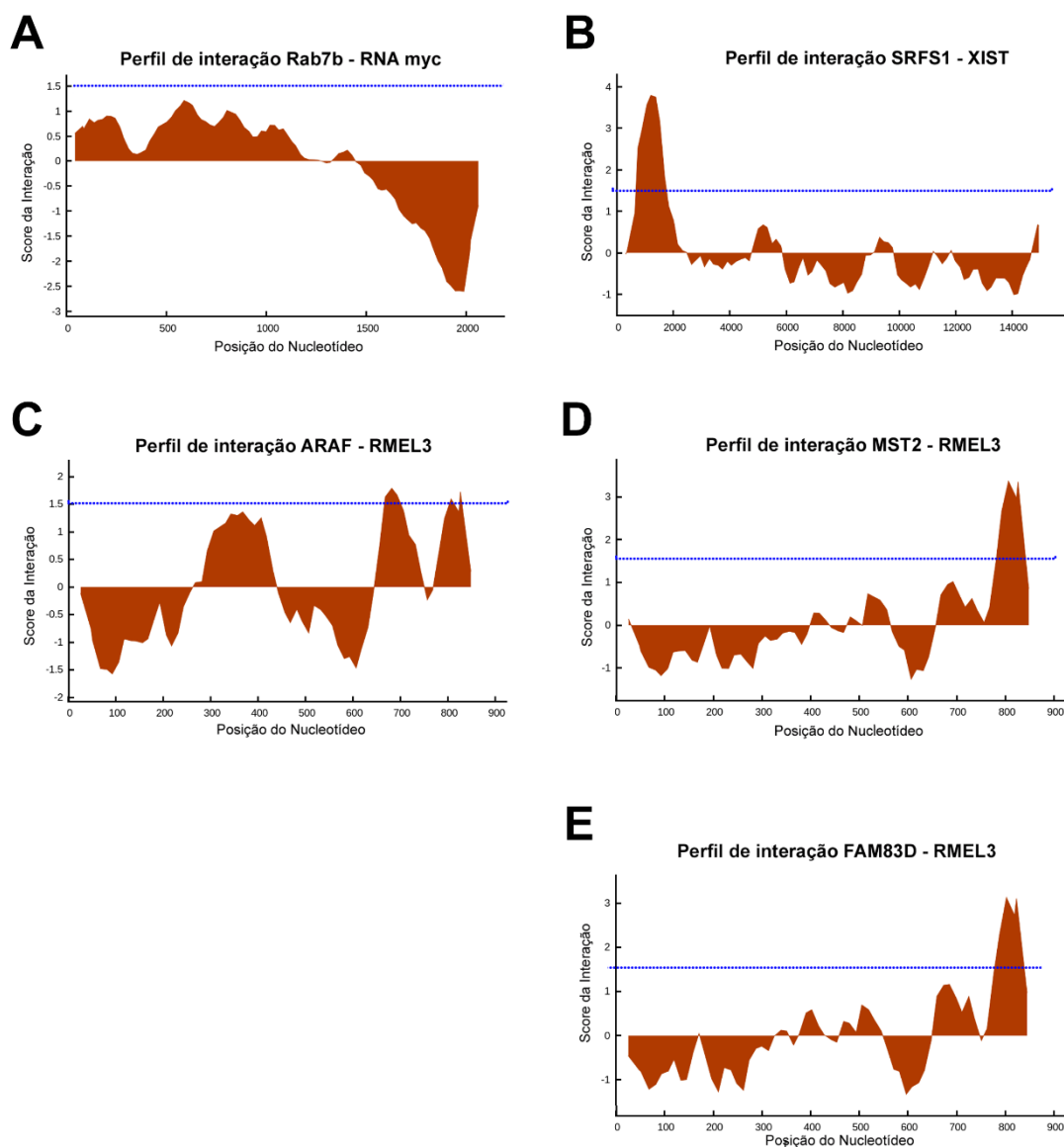


Figura 35 - Predição da interação de RMEL3 com as proteínas ARAF, MST2 e FAM83D *in silico*. Representação gráfica do perfil de interação Proteína-RNA, com score de interação da proteína de interesse (eixo Y) ao longo da sequência do RNA (eixo X). **(A)** Controle negativo de interação: Perfil de interação de Rab7 com o RNA myc. **(B)** Controle positivo de interação: Perfil de interação de SRFS1 com o lncRNA XIST. **(C)** Perfil de interação de ARAF com o transcrito T-A375_1 (RMEL3 canônico de A375). **(D)** Perfil de interação de MST2 com o transcrito T-A375_1. **(E)** Perfil de interação de FAM83D com o transcrito T-A375_1.

As sequências de ARAF, MST2 e FAM83D não estavam disponíveis no site do catRAPID, portanto, as sequências de aminoácidos canônicas das proteínas analisadas foram obtidas através do banco de dados de proteínas UniProt (Coudert et. al., 2023), enquanto as sequências do transcrito T-A375_1 foram obtidas por Sequenciamento Sanger (Figura 16). As análises foram feitas utilizando dois pares de proteína-RNA validados como controles de interação: o controle negativo com a proteína Rab7b e o RNA Myc (Siprashvili et al., 2012 – Figura 35A) e o controle positivo proteína SRFS1 e

o RNA longo não codificante XIST (Royce-Tolland et al., 2010 – Figura 35B). Esses controles foram utilizados para a comparação dos perfis de picos de interação para determinar quais valores de *score* normalizados deveriam ser considerados significativos para uma possível interação, uma vez que mesmo o controle negativo possui algumas regiões de score positivo de interação, embora bastante reduzidos, não superando o valor de 1,5. Quando analisamos o T-A375_1, observamos um pico de interação nas posições correspondentes ao éxon 4 compartilhado entre todas as proteínas, apesar de diferentes scores de interação entre elas (Figura 35). Dentre as 20 regiões de ARAF com maior score de interação com RMEL3, 14 das interações ocorrem entre os nucleotídeos 750-805 como evidenciado no perfil de interação (Figura 35C). O maior score (2,8) pertence a interação entre os aminoácidos 301-352 de ARAF e os nt 752-803 de RMEL3 e tem uma propensão de interação de 10,48 (Tabela Suplementar 1). Já em MST2, 19 interações ocorrem no intervalo de 750-805 nt de RMEL3 (Figura 35D), e a interação com maior score (3,58) é entre os aminoácidos 301-353 de MST2 e os nt 752-803 de RMEL3 e possui uma propensão de interação de 13,14 (Tabela Suplementar 2). Em FAM83D também são 19 interações no mesmo intervalo das anteriores (Figura 36D), sendo a com maior score (3,43) possui uma propensão de interação de 11,21 e ocorre entre os aminoácidos 201-252 de FAM83D e nt 752-803 de RMEL3 (Tabela Suplementar 3).

4.5 O silenciamento do RMEL3 altera o perfil de expressão gênica nas células A375

Visto que a expressão de RMEL3 vem se mostrando importante para a manutenção de vários fenótipos tumorais nas células de melanoma, além da correlação já conhecida de diversas características clinico-patológicas com a expressão de RMEL3 (Goedert et al., 2016), decidimos analisar o perfil transcricional das células A375 shRMEL3 #4 comparadas às células controle (A375 shLacZ). Além disso, Cardoso et al. (2019) mostraram que a superexpressão de RMEL3 protege células de melanoma e células NIH3T3 (não transformadas) da parada de proliferação e morte celular causadas pela privação de soro fetal bovino, fonte de mitógenos, fatores de crescimento e de sobrevivência. Assim, postulamos que o RMEL3 poderia desempenhar algum papel relacionado ao controle do ciclo celular ou da morte celular, durante a privação de soro ou na resposta ao estímulo por soro após um período de privação. Para começar a explorar esta função, avaliamos o perfil de expressão nas células estimuladas por 4h com 10% de

soro fetal bovino depois de 72h de privação de mitógenos. A estimulação por 4h foi realizada com o objetivo de detectar se há alteração no perfil de expressão de genes induzidos pelo estímulo com os fatores contidos no soro fetal bovino. O programa transcricional induzido por este tipo de estímulo é classicamente descrito em dois estágios: a indução independente da síntese proteica rápida de genes precoces imediatos, seguida pela indução subsequente dependente da síntese proteica de genes de resposta secundária. O tempo de 4h de estímulo é descrito como um tempo favorável para detectar tanto genes precoces imediatos, como genes de resposta primária atrasada e genes de resposta secundária (Tullai et al., 2007).

Foi feita a privação de mitógenos, ou seja, o cultivo em meio DMEM sem SFB, com intuito de reduzir importantes vias proliferativas, como MAPK e PI3K. Apesar da A375 possuir a mutação BRAFV600E que mantém a via de MAPK constitutivamente ativa, constatamos anteriormente que a privação de SFB por 72h reduz os níveis de ativação da via de MAPK e PI3K (Figura 24). Afim de verificar se o nível de fosforilação de ERK1/2 nas células A375 após o silenciamento de RMEL3 chegava a atingir o nível de ativação da controle, realizamos a marcação de pERK1/2 nas condições normais de cultura, privadas de SFB por 72h e estimuladas com 10%SFB por 4h após privação de soro (Figura 36). A ativação de ERK1/2 (pERK1/2) nas células silenciadas é menor que nas controles em todas as condições avaliadas, confirmando mais uma vez que o silenciamento de RMEL3 interfere na ativação da via de MAPK.

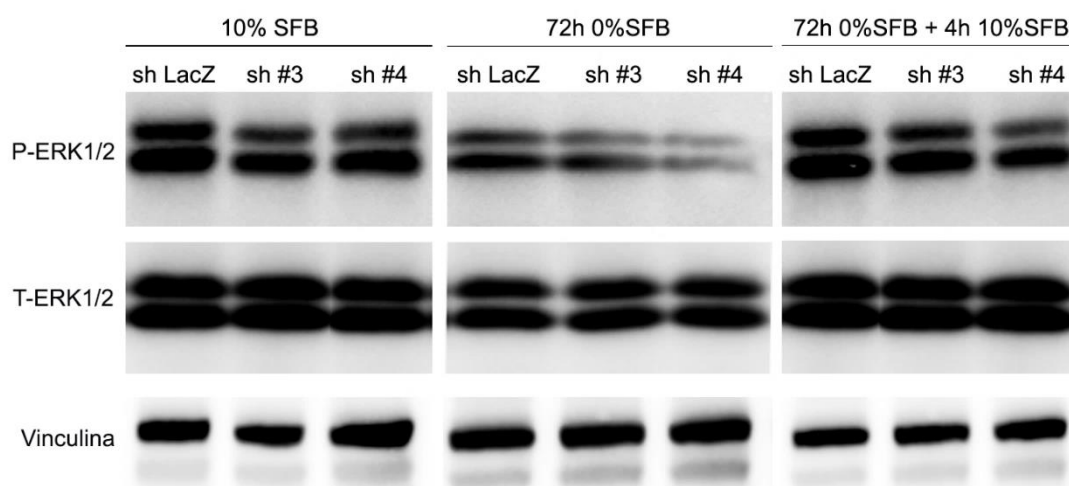


Figura 36 – Ativação da via de MAPK é reduzida nas células de melanoma A375 silenciadas para RMEL3. Imagem representativa da Imunodeteção de ERK1/2 fosforiladas (p-ERK1/2); ERK1/2 total (t-ERK1/2) e vinculina (normalizador de carga proteica) nos lisados de A375 sh LacZ, RMEL3 #3 e RMEL3 #4 cultivadas com DMEM 10%SBF, cultivadas por 72h em DMEM 0%, estimula com DMEM 10%SBF após 72h de privação.

Para a análise do perfil transcricional utilizamos as células A375 shRMEL3 #4, que apresentaram o silenciamento mais efetivo – cerca de 90% (Figura 37A). Esta linhagem também apresentou as maiores alterações nos fenótipos analisados. Como controles foram utilizadas as células A375 shLacZ. Em todas as amostras sequenciadas (n=3 por célula), foram obtidos, no mínimo, 50 milhões de *reads*, onde mais de 89% dos RNAs detectados são pertencentes a proteínas codificantes e cerca de 1,5 – 1,6% são lncRNAs (Anexo 4). Foram detectados 2368 genes diferencialmente expressos, estatisticamente significantes (\log_2 fold change <-1 e >1 ; FDR p-value $< 0,05$) na comparação A375 shRMEL3 #4 versus A375 shLacZ (Figura 37 B). Para nossas primeiras análises, consideramos 408 DEGs (Differently Expressed Genes), onde esses genes que tiveram o enriquecimento de \log_2 fold change <-2 e >2 (FRD p-value 0,05). Dentre os DEGs obtidos, 124 genes foram regulados positivamente e 284 foram regulados negativamente após o silenciamento de RMEL3 (Figura 37C).

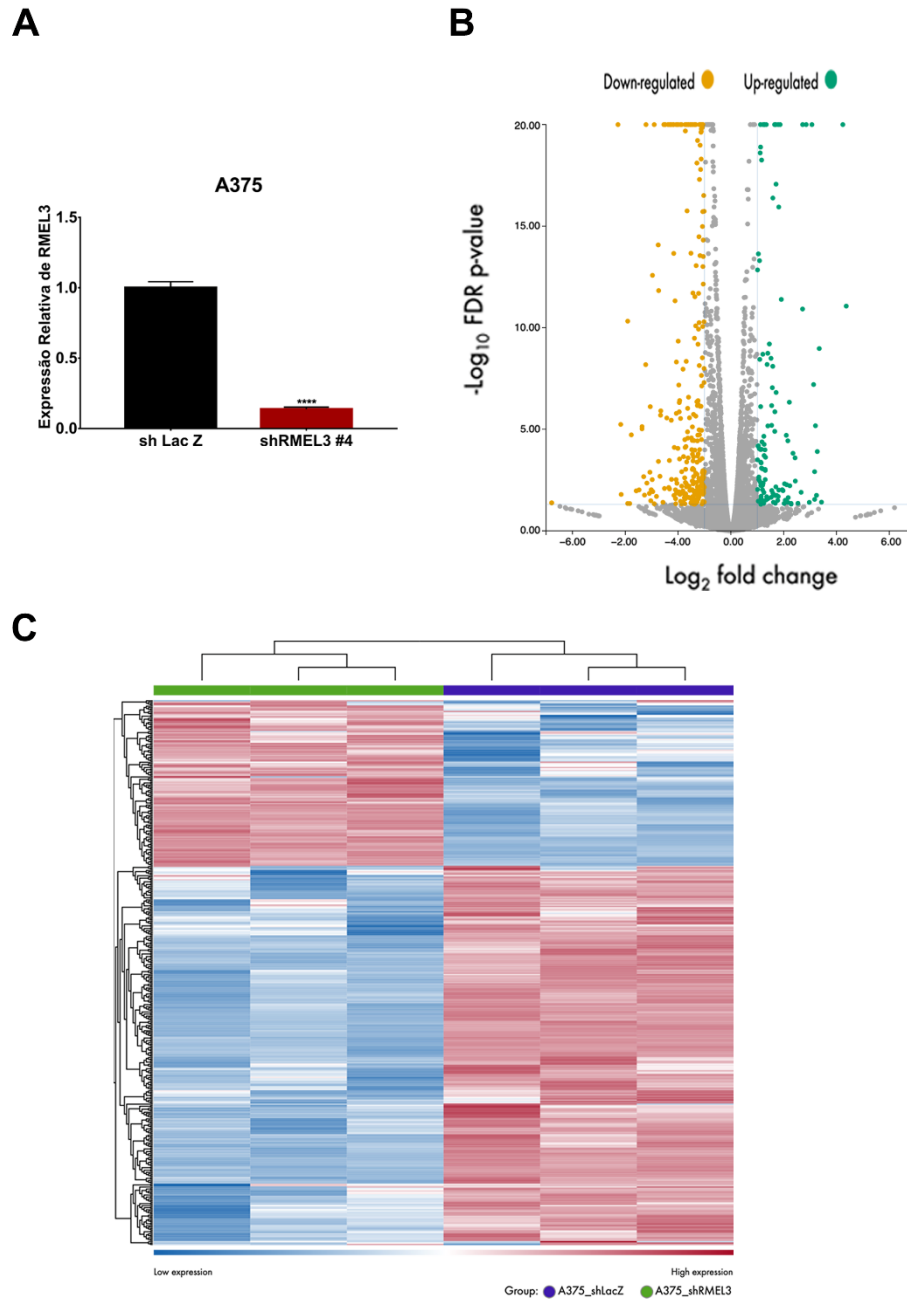


Figura 37 – Análise do sequenciamento em larga escala de RNA das células A375 shRMEL3 #4 comparada a A375 sh LacZ. (A) Expressão relativa de RMEL3 na linhagem de melanoma A375 shRMEL3 #4 e controle (shLacZ) das amostras utilizadas para sequenciamento de RNA em larga escala. Os valores plotados são relativos ao controle sh LacZ. O gene TBP foi usado como controle endógeno. A expressão relativa foi calculada com a fórmula $2^{-\Delta\Delta Ct}$. O gráfico representa a média \pm SEM (n=3), **** P < 0,0001. (B) Gráfico Volcano exibindo os genes diferencialmente expressos (\log_2 fold change < -1 ou > 1; FDR p-value < 0,05). (C) *Heatmap* dos exibindo os genes diferencialmente expressos (\log_2 fold change < -2 ou > 2; FDR p-value < 0,05).

4.5.1 Enriquecimento funcional dos DEGs detectados no silenciamento de RMEL3

Buscando identificar em quais processos biológicos os DEGs estariam envolvidos, realizamos análises de enriquecimento GO e KEGG. A análise de *Gene Ontology* (GO) é frequentemente usada em estudos de enriquecimento funcional. Além disso, os termos GO enriquecidos podem ser categorizados em processo biológico (BP), função molecular (MF) e componente celular (CC). A *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* (KEGG) é um banco de dados projetado para analisar sistematicamente as vias metabólicas e as funções dos produtos gênicos nas células. O resultado da análise GO expôs que os DEGs com expressão reduzida após o silenciamento de RMEL3 foram enriquecidos principalmente nos termos GO relevantes para as células imunes como processamento e apresentação de antígenos via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) classe II, resposta celular a interferon gama (IFN γ), regulação da proliferação de linfócitos (Figura 38A). Esse enriquecimento se deve, principalmente, pela drástica redução da expressão de doze genes de antígeno leucocitário humano (HLA) de classe II, além da redução da expressão de CD74, também conhecido como cadeia invariante associada ao MHC classe II e do gene-3 de ativação de linfócitos de checkpoint imunológico inibitório (LAG3) (Figura 38B). Outro importante componente de células imunes que aparece com expressão alterada após o silenciamento de RMEL3 é o TLR9, um receptor Toll-Like que reconhece motivos desoxicitidil-fosfato-desoxiguanosina (CpG) não metilados presentes em genomas bacterianos e virais, que aparece incluído no processo molecular regulação da proliferação de linfócito B (Figura 38^a, Tabela Suplementar 5).

Termos GO relacionados com a matriz extracelular também aparecem enriquecidos nos DEGs regulados negativamente, como organização da estrutural extracelular, matriz extracelular contendo colágeno, constituintes estruturais da matriz extracelular (Figura 38A). Dentre os genes silenciados, estão vários membros da superfamília do colágeno, como COL11A1, COL19A1, COLL22A1 e COL4A6 (Figura 39C e Tabela suplementar 5). Os colágenos COL19A1 e COL22A1 participam do processo biológico denominado organização da estrutura extracelular, juntamente com o proteoglicano aggrecan (ACAN), da fibulina-5 (FBLN5), glicoproteína M6B (GPM6B) e outros (Figura 38C).

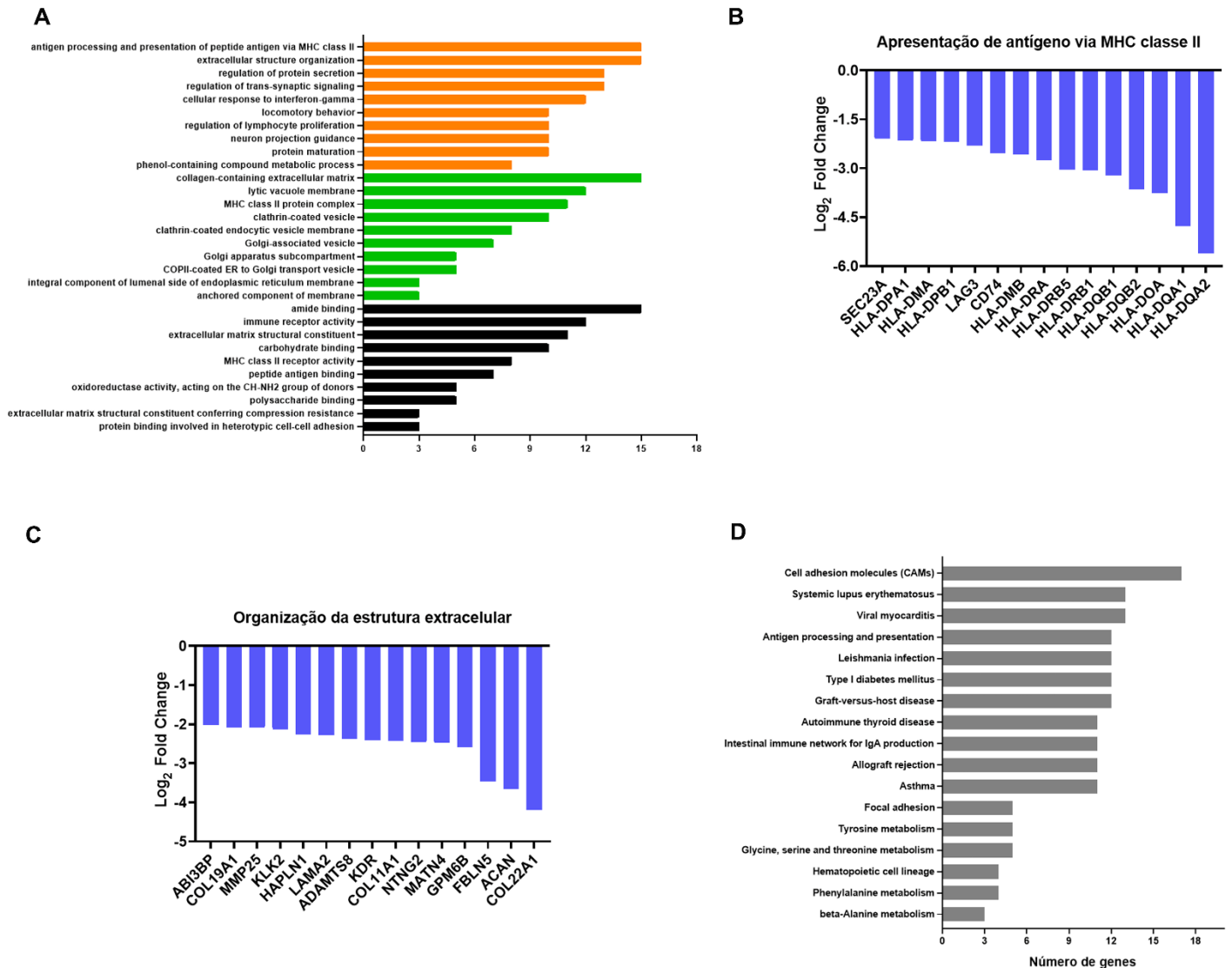


Figura 38 – Análise de enriquecimento funcional de DEGs regulados negativamente. (A) Os resultados da análise de anotação GO processo biológico (barras laranja), componente celular (barras verdes) e função molecular (barras pretas) dos DEGs regulados negativamente. (B) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica apresentação de antígeno via MHC de classe II no enriquecimento GO. (C) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica organização da estrutura extracelular no enriquecimento GO. (D) Os resultados da análise de enriquecimento das vias KEGG de DEGs regulados negativamente após silenciamento de RMEL3. A Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA) foi feita no site <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/annotate.jsp>, foram computadas sobreposições dos DEGs regulados negativamente com outros conjuntos de genes no MSigDB.

A análise de enriquecimento de KEGG (Figura 38D) mostrou que os DEGs silenciados foram enriquecidos principalmente nas vias de adesão celular, doenças autoimunes, como Lúpus eritematoso sistêmico, Diabetes mellitus tipo 1, doença do enxerto contra hospedeiro, doença autoimune da tireoide e asma. A via de processamento de antígeno também é enriquecida, como também vias de infecções por patógenos, como

Cardiomiopatia viral e Leishmaniose. Os DEGs regulados negativos também participam de vias de metabolismo de aminoácidos e da adesão focal (Figura 38D).

Repetimos as mesmas análises com os DEGs regulados positivamente, e a obtivemos que os principais termos GO enriquecidos para estes genes foi a de sinalização Fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K), reconhecimento de fagocitose, processos migratórios e desenvolvimento, além de termos relacionados com adesão celular (Figura 39A). Dentre os genes associados a sinalização de PI3K foram alocados genes que participam direta e indiretamente da via, podendo promover a ativação ou inibição ou ser alvo da via. Detectamos o receptor acoplado a proteínas G PAR2 (F2RL1), um receptor amplamente expresso nos tecidos vasculares e extravasculares e sua primeira funções descritas foi nas respostas à lesão vascular e na regulação da inflamação (Shi et al., 2004). A ativação deste receptor vem sendo associada a regulação da progressão maligna do câncer influenciando a via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e suas principais vias a jusante: MAPK/ERK e PI3K/ AKT (Tang et al., 2019; Li et al., 2022) (Figura 39B). Outro receptor regulado positivamente após silenciamento de RMEL3 foi o receptor transmembrana tirosina-quinase inativo ROR1, que em melanoma foi descrito como alvo da via de PI3K/AKT, e quando ativado por esta via regula a expressão de N-caderina durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM) (Pontes et al., 2015) (Figura 39B).

Também está superexpresso em nossas células de estudo fator de crescimento transformante TGF β 2, que desempenha vários papéis importantes no desenvolvimento embrionário e na progressão do tumor através do ativação da via de sinalização TGF- β . Tradicionalmente, a sinalização de TGF- β no câncer usa a via canônica Smad e inicialmente exerce atividades antiproliferativas, entretanto em estágios posteriores da progressão do tumor, o aumento de expressão dea expressão TGF- β 2 leva a uma sinalização diferenciada do receptor TGF- β , que passa nesse momento a manter hiperativa a via de PI3K/AKT (Xue et al., 2012; Liu et al., 2018) (Figura 39B).

Outro fator de crescimento que teve aumento na expressão foi o PDGFG (Fator de crescimento derivado de plaquetas - G) (Figura 39B). A isoforma PDGF-G é secretado como um homodímero ligado por dissulfeto, que sofre proteólise para se tornar ativo e se ligar especificamente ao receptor PDGF- β e ativar vias de sinalização a jusante, como PI3K/AKT e MAPK/ERK (Bergsten et al., 2001; Jing-Feng et al., 2022) (Figura 39B). Também foram associadas a sinalização PI3K/AKT e com aumento de expressão, apareceu o fator de transcrição específico para células T de ação trans GATA-3 (GATA3)

que em células tumorais promove a transcrição do ativador NCAPH da via de PI3K/AKT, ativando assim a via (Qi et al., 2021).

As proteína reelin (RELN) e mucina-5A (MUC5AC) também aparecem aumentadas no silenciamento de RMEL3. A reelin que promove a ativação da via de PI3K/AKT e redução da autofagia e apoptose em células em vários tipos de câncer (Ling et al., 2021; Qu et al., 2022), e a mucina-5A a mucina-5A (MUC5AC), é um componente glicoproteico do muco das vias aéreas e superexpressa em diversos tipos de câncer e tem a expressão controlada pelas vias de PI3K/AKT e MAPK/ERK (Yang, 2020; Chen et al., 2022). Estas duas últimas proteínas também possuem papel na organização do citoesqueleto e matriz extracelular, respectivamente, e participam de vias de migração celular (Figura 39C).

No processo de adesão celular, foram associados as integrinas alfa-1 (ITGA1) e alfa 8 (ITGA8), o receptor EPH A3 (EPHA3), a proteína relacionada com matriz FRAS1 (FREM1), receptor tipo tirosina-quinase O (PTPRO) e um membro da superfamília dos inibidores da serina proteinase Serpine-1 (SERPINE1). Os três genes codificantes de proteínas que foram mais superexpressos no silenciamento de RMEL3 foram o UNC5D, MEF10 e CD36 (Figura 39C). O UNC5D codifica a proteína o receptor Unc-5 Netrin D que está envolvido na adesão célula-célula via moléculas de adesão à membrana plasmática e desempenha um papel na adesão célula-célula e orientação celular, e é o receptor para netrina envolvido na migração celular em axônios (GeneCard GC08P035235; Stelzer et al., 2016). A proteína com vários domínios semelhantes a EGF 10 (MEGF10) desempenha um papel na adesão celular, motilidade e proliferação, e é um mediador crítico da fagocitose celular apoptótica, bem como da absorção do peptídeo beta-amiloide no cérebro (GeneCard GC05P127230; Stelzer et al., 2016). E CD36 codifica a quarta maior glicoproteína da superfície plaquetária e serve como receptor para trombospondina em plaquetas e várias linhagens celulares. Como as trombospondinas são proteínas amplamente distribuídas envolvidas em uma variedade de processos adesivos, essa proteína pode ter funções importantes como molécula de adesão celular (GeneCard GC07P080369; Stelzer et al., 2016).

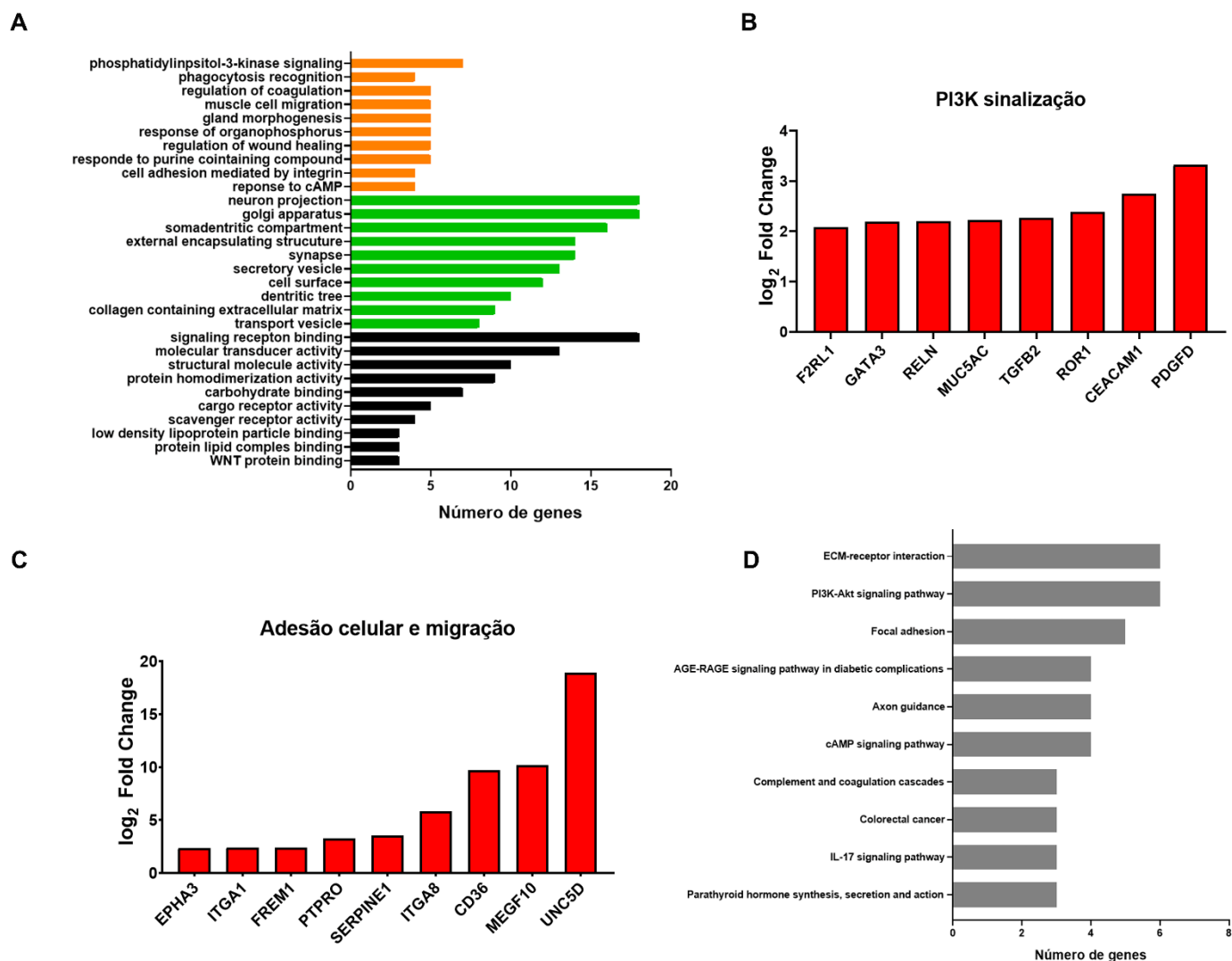


Figura 39 – Análise de enriquecimento funcional de DEGs regulados positivamente. (A) Os resultados da análise de anotação GO processo biológico (barras laranja), componente celular (barras verdes) e função molecular (barras pretas) dos DEGs regulados positivamente. (B) Genes regulados positivamente nas células silenciadas para RMEL3 listados na função biológica apresentação de sinalização de PI3K no enriquecimento GO. (C) Genes regulados negativamente nas células silenciadas para RMEL3 listados nas funções biológicas de adesão celular e migração no enriquecimento GO. (D) Os resultados da análise de enriquecimento das vias KEGG de DEGs regulados negativamente após silenciamento de RMEL3. A Análise de Enriquecimento do Conjunto de Genes (GSEA) foi feita no site <https://www.gsea-msigdb.org/gsea/msigdb/human/annotate.jsp>, foram computadas sobreposições dos DEGs regulados negativamente com outros conjuntos de genes no MSigDB.

A análises de vias KEGG dos DEGs com aumento de expressão mostrou a via de interação receptor-matriz extracelular (MEC) como a mais enriquecida, seguido da via de sinalização de PI3K-AKT, como mostrado também na análise GO (Figura 39A e D). A via de orientação de axônio é uma importante via de migração desse tipo de célula. Outras vias enriquecidas foram a de AGE-RAGE em condições diabéticas, sinalização de cAMP,

cascata do sistema complemento e coagulação, sinalização por interleucina 17 (IL-17) e síntese, secreção e ação de hormônios da paratireoide (Figura 39D).

4.5.2 RMEL3 regula a expressão de importantes genes da resposta imunológica

Dentre os DEGs observados nos silenciamento de RMEL3, a classe de genes que mais se destacou foram os genes com função relevantes para resposta imunológica. Muitos desses genes têm expressão e função caracterizadas nas células do sistema imune e que tem a expressão reativada em células tumorais. Com interesse de investigar mais sobre a regulação de RMEL3 na imunogenicidade do melanoma, buscamos se teriam mais genes regulados nas células silenciadas para RMEL3. A análise GO de todos os genes regulados (Tabela Suplementar 4), apresentou diversos termos relacionados com sistema imune, sendo os mais significativos a apresentação de antígeno via MHC de classe II (Figura 39), proliferação de linfócito B e apresentação de antígeno via MHC de classe I (Figura 40).

Dentre os genes envolvidos na ativação de linfócito T, 29 genes tem expressão reduzida após silenciamento de RMEL3 (Figura 40A) e os com maiores reduções foram: TMEM98, que codifica uma proteína transmembrana que quando secretada promove a diferenciação dos linfócitos T helper 1 (Th1) (W. Fu et al., 2015), a interleucina 1 β (IL1B), uma citocina pró-inflamatória que promove a ativação de neutrófilos, células T e células e produção de citocinas (Van Damme et al., 1985), o DTX1, que hoje é sabido que exerce controle na estabilidade dos linfócitos T regulatórios (Treg) (Hsiao et al., 2015), a TNF14 (TNFSF14) que fornece sinais coestimulatórios às células T, levando à proliferação de células T e produção de interferon gama (IFN γ) (Tamada et al., 2000), o fator de nuclear de células T ativadas-2 (NFATC2) que em linfócitos desempenha um papel na expressão induzível de genes de citocinas em células T, especialmente na indução de IL-2, IL-3, IL-4, TNF-alfa ou GM-CSF (Peng et al., 2001), os genes CXADR e SOX13 e das butirofilinas BTN2A2 e BTN3A1, que atuam como moduladores de células T gama-delta e diferenciação de células T gama-delta, uma subpopulação de células T que residem nos epitélios (Excoffon et al., 2005; Spicuglia et al., 2007) (Figura 40A)

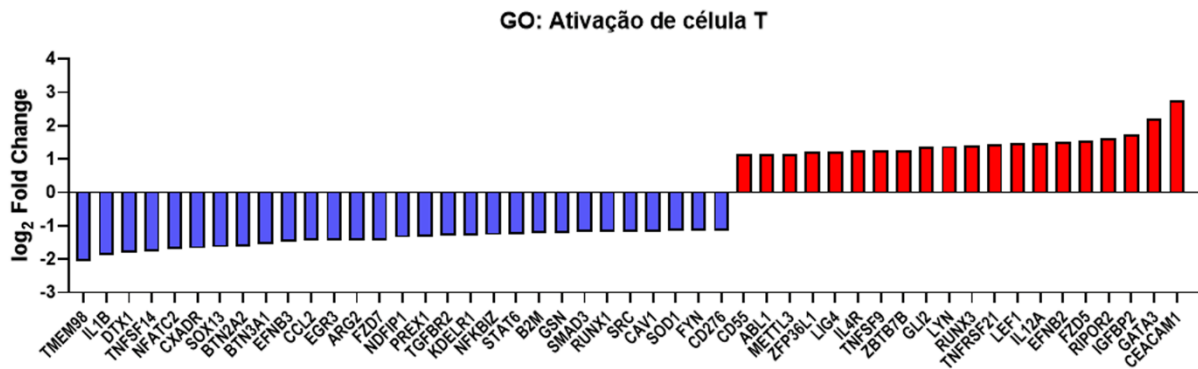
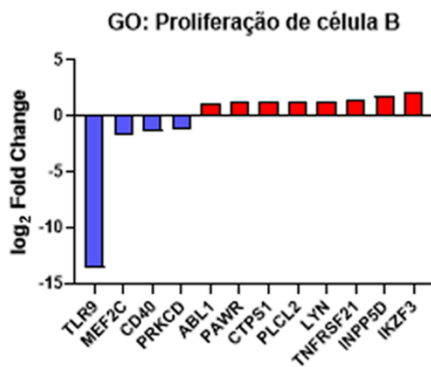
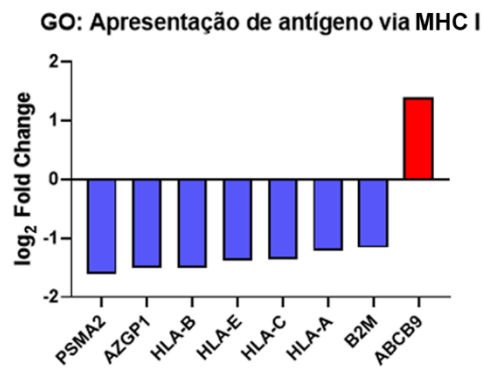
A**B****C**

Figura 40 – RMEL3 regula genes de ativação de linfócitos T, proliferação de células B e apresentação de antígeno via MHC de classe I.

Ainda na regulação de células T, 20 genes tiveram aumento de expressão, sendo os com maior expressão o gene CAECAM1, que é superexpresso na maioria dos casos de melanoma metastático e o protege de um ataque imunológico inibindo a morte mediada por linfócito T e promove a apoptose das células *natural killer* (NK) (Helfrich & Singer, 2019). O segundo gene mais expresso foi fator de transcrição GATA3 que quando expresso em linfócitos atua como regulador principal da diferenciação de células Th2 através da expressão de IL-4, IL-5 e IL-13 (Wan, 2014). A expressão de GATA3 em melanomas vem sendo associada ao fenótipo desdiferenciado que leva a perda da expressão de componentes convencionais ou de características histológicas e imunofenotípicas de melanoma (Massi et al., 2020). Em seguida aparece IGFBP2, que tem a expressão relacionada com aumento de infiltração de Treg no microambiente do tumor promovendo um ambiente imunossupressor (L. Sun et al., 2022) (Figura 40A).

Dentro os genes que regulam a proliferação de células B, o mais silenciado é o receptor TLR9, comentado anteriormente, e no geral os genes foram mais superexpressos do que reduzidos (Figura 38). Assim como outros TLR, a expressão de TLR9 desempenha um papel duplo no microambiente tumoral. Quando expressa por células imunes, por exemplo, células dendríticas, células NK e macrófagos, tem função antitumoral ativando a resposta imune inata e adaptativa pela ativação de linfócitos B. Já quando TLR9 é expresso nas células tumorais, ele tem função pró-tumoral, promovendo um ambiente inflamatório que induz a sobrevivência e proliferação de células tumorais (Chen et al., 2022).

Genes da apresentação de antígenos via MHC de classe I também foram reduzidos no silenciamento de RMEL3 (Figura 40). Os HLA de classe I (HLA-A/B/C) e a cadeia leve invariante B2M tiveram redução de expressão, juntamente com o proteossoma PSMA2 que participa da geração de antígenos apresentados via MHC de classe I, e da glicoproteína ZAG (AZGP1), que é um gene parálogo de HLA-B com possível participação na via de MHC de classe I (Hassan et al., 2008), mas muito mais conhecida por ser mobilizador de lipídeo relevante para metástase de alguns tipos de câncer (Cao et al., 2019). O único gene superexpresso e relacionado com a apresentação de antígeno via MHC classe I e II foi o transportador associado ao processamento de antígenos ABCB9.

4.5.3 Silenciamento de RMEL3 levou a alteração na expressão de genes associados a via de LPA e migração celular

Em nossas análises de enriquecimento, dois genes com drástica redução da expressão após silenciamento de RMEL3 não foram contemplados nas vias encontradas: EPNN2 e LPAR4 (Figura 43A). O ENPP2 codifica a proteína autotaxina (ATX), uma enzima secretada com atividade de lisofosfolipase D, tendo como função primária a hidrólise extracelular da lisofosfatidilcolina (LPC) a ácido lisofosfatídico (LPA), um lipídio bioativo, e o LPAR4 codifica um dos seis receptores LPA acoplados à proteína G descritos em humanos. O LPA é o considerado principal fator soro fetal que medeia múltiplas funções biológicas, que inclui migração e invasão (Imamura et al., 1993) através de pequenas GTPases da família Rho que conduzem alterações do citoesqueleto baseadas em actina, e a proliferação e sobrevivência através das vias AKT e ERK (K. H. Lin et al., 2020) (Figura 41).

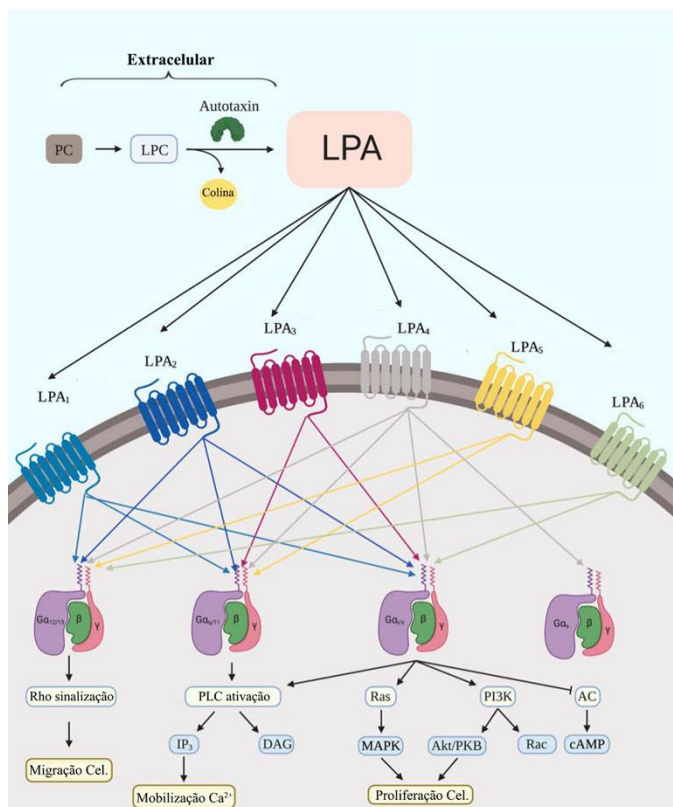


Figura 41 - Metabolismo do LPA e a sinalização do receptor LPA. A geração de LPA é catalisada por autotaxina extracelular secretada, e as funções do LPA são induzidas pela ativação de receptores LPA acoplados à proteína G, podendo ativar as vias de sinalização de RhoA, PLC, Ras, PI3K e inibir a via de AC. Adaptada de K. H. Lin et al., 2020.

A redução de dois genes centrais da sinalização de LPA juntamente com a redução significativa da capacidade migratória e invasiva observada nas células silenciadas para RMEL3 (Figura 29) nos motivou a analisar se outros genes relacionados a esta via foram

regulados após o silenciamento de RMEL3. Além da ATX e LPAR4, outro receptor de LPA foi regulado negativamente em nossas células, o LPAR2 (Figuras 42A). Os receptores de LPA se acoplam a pelo menos um ou mais das quatro proteínas G α heterotrômicas (G $\alpha_{12/13}$, G $\alpha_{q/11}$, G $\alpha_{i/o}$ e G α_s), resultando em sinalização canônica a jusante que produz diversos efeitos fisiológicos e fisiopatológicos (Figura 41). O gene que codificam a proteína G $\alpha_{i/o}$ (GNAO1) foi regulado negativamente, enquanto o gene da proteína G $\alpha_{q/11}$ teve expressão aumentada após o silenciamento de RMEL3 (Figura 42A). A via de sinalização ativada por LPA e que promove a migração é a via de Rho, que promovem reorganização do citoesqueleto de actina e migração celular (Figura 42). Focando nesta via, encontramos a redução de: RhoB e RhoC, membros da família de Rho GTPases que também são ativadas via LPA (Fleming et al., 1996); a proteína efetora 5 do CDC42 (CDC42EP5), proteína conhecida por interagir com septinas e regular sua função na angiogênese, neurotransmissão e desmoplasia associada ao câncer (Farrugia & Calvo, 2016); a redução de SHTN1 que codifica a proteína shootin1 que promove o regulação F-actina em cones de crescimento coopera com a polimerização de actina para motilidade celular eficiente (Kubo et al., 2015); além da Rhotekin (RTKN) proteína efetora para a pequena GTPase Rho (Ito et al., 2018), e a RhoGAP5 (ARHGAP5) (Figura 42B). Dentre os genes com aumento da expressão, teve a GEF-H1 (ARHGEF20) e GEF720 (PLEKHG5), ambas são fatores de troca nucleotídeos de guanina (GEF) que

atuam na ativação das Rho GTPases, a ROCK2 que atua na estabilização dos filamentos de actina e reduz a capacidade migratória das células (Sadok et al., 2015), a CDC42EP1, que atua de maneira semelhante a CDC42EP5 e a RIPOR2, um inibidor de RhoA (Lv et al., 2022) (Figura 42B).

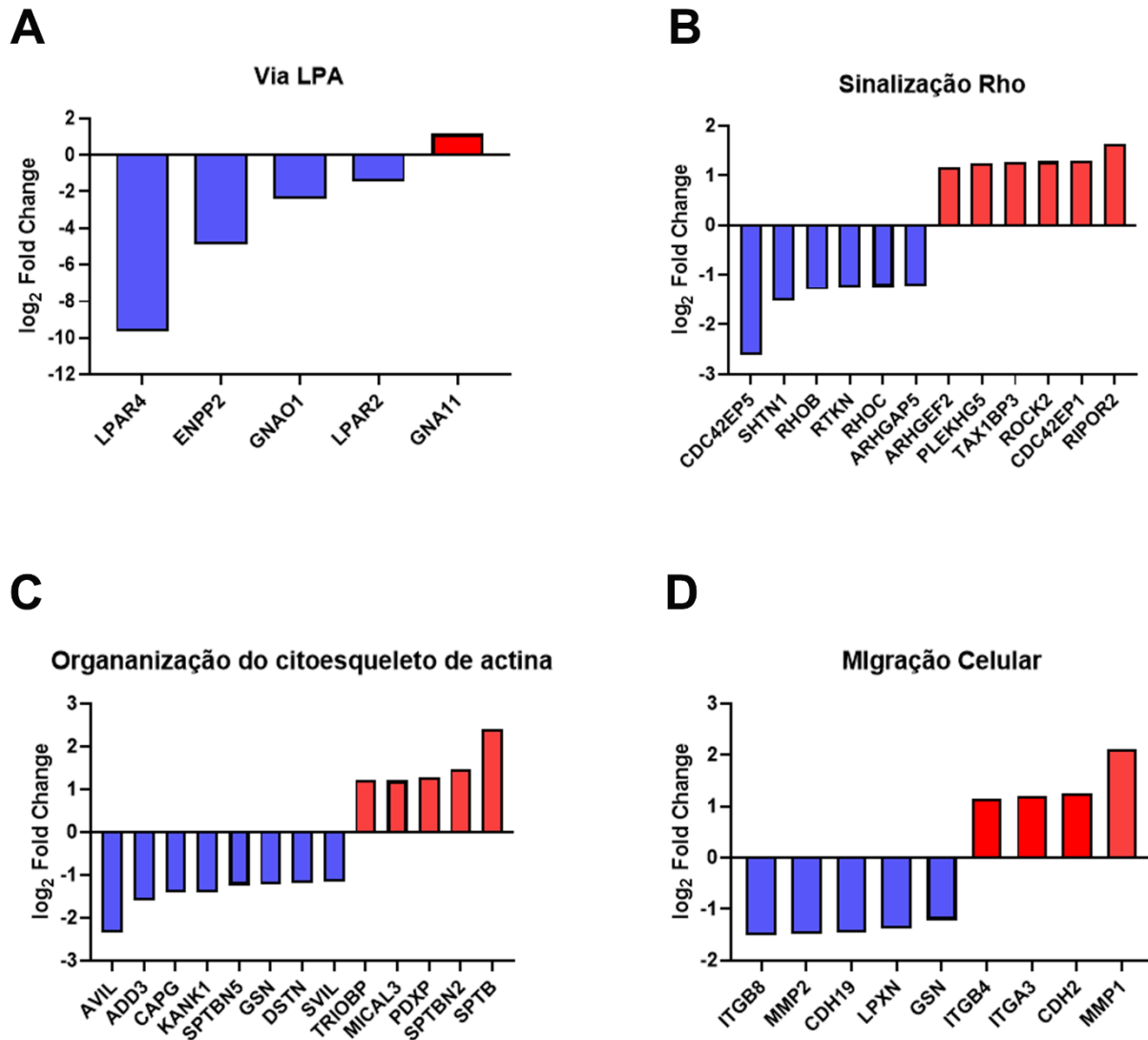


Figura 42 – Vias ativadas pelo ácido lisofosfatídico. (A) Genes regulados por RMEL3 da via do início da sinalização por LPA e (B) que participam da sinalização Rho ativada por LPA. (C) Genes regulados por RMEL3 que atuam na organização do citoesqueleto de actina e (D) migração celular.

Além dos genes reguladores de citoesqueleto de actina listados na via de sinalização de Rho, outros genes responsáveis pela organização do citoesqueleto de actina e participantes de eventos de migração celular são regulados por RMEL3. Proteínas de ligação a actina, como adivilina (AVIL), aducina 3 (ADD3), CAPG e SPTBN5 estão reduzidas na ausência de RMEL3. Também estão reduzidas as proteínas que regulam a

polimerização e despolimerização da actina, como KANK1, que regula a polimerização da actina e motilidade celular (Kakinuma et al., 2009); a gelsolina (GSN) uma moduladora de actina que se liga às extremidades positivas de monômeros ou filamentos de actina, e em células de melanoma se ligam especificamente com a ACTBL2, uma isoforma actina que compartilha o locus gênico com o RMEL3 (Figura 4), impedindo a troca de monômeros (Mazur et al., 2016); do fator de despolimerização de actina DSTN e SVIL que tem atividade semelhante a gelsolina e atua na regulação da miosina II durante a propagação celular. Os genes superexpressos são: TRIOBP, que regula a organização do citoesqueleto de actina, espalhamento celular e contração celular por ligação direta e estabilização da F-actina filamentosa; MICAL3 que promove a despolimerização da F-actina resultando na desmontagem do filamento de actina e impedindo a repolimerização; PDXP que regula a reorganização do citoesqueleto de actina dependente de cofilina; e SPTB, principal constituinte da rede do citoesqueleto subjacente à membrana plasmática que se à actina para formar a superestrutura do citoesqueleto da membrana plasmática dos eritrócitos (Figura 42C). Atuando na migração, alguns genes se repetem do gráfico anterior, genes regulados negativamente foram: a integrina $\beta 8$ (ITGB8) já descrita por participar da regulação e angiogênese em glioblastoma (Liu et al., 2022), a metaloproteinase MMP2, a caderina CDH19, o membro da família de paxilinas LPXN e GSN. Os genes superexpressos foram: as integrinas ITGBA4 e ITGA3, a caderina CDH2 e metaloproteinase MMP1 (Figura 42D).

4.5.4 Vias moleculares clássicas de melanoma são reguladas pelo silenciamento de RMEL3

Um dos objetivos de avaliarmos a expressão gênica das células silenciadas para RMEL3 foi entender como essas células respondem a fatores de crescimento, visto que os principais fenótipos que analisamos são influenciados por vias de proliferação e sobrevivência ativadas por esses fatores. Comparamos os genes regulados após o silenciamento de RMEL3 nas células A375 com os genes do programa transcricional de fatores de crescimento com os expressos pela linhagem de glioblastoma T98G descritos em Tullai et al., 2007.

Dentre todos os genes alterados (Tabela Suplementar 4) nas células A375 shRMEL3 #4, 47 genes são relacionados com o programa transcricional induzido pela estimulação de fatores de crescimento, onde 21 são genes precoces imediatos (Figura

43A), 19 são genes de resposta primária atrasada (Figura 43B) e 7 são genes de resposta secundária (Figura 43C). Após estímulo com fatores de crescimento por 4 horas, nas células T89G os genes precoces imediatos são expressos quase que em níveis basais, enquanto na A375 shRMEL3 grande parte tem expressão reduzida. A expressão de ATF3, JUNB, PMAIP1 e FLG em T89G é negativa ou basal, enquanto nas células silenciadas para RMEL3 estes mesmos genes são superexpresso no tempo estudado. O contrário ocorre com os genes JUN, NR4AI, FOSB, RCAN1 e NFKBIZ, onde a expressão é positiva nas células T89G e nas células A375 shRMEL3 são regulados negativamente (Figura 43A). No tempo analisado, quase todos os genes de resposta primária tardia são expressos nas células T89G em resposta a fatores de crescimento, enquanto nas células silenciadas os genes somente EPHAN2, SPEN, COL4A1, TNFAIP2, ARSJ e F2RL1 são regulados positivamente (Figura 43B). Esses níveis indicam que a resposta das células silenciadas para RMEL3 pode estar atrasada ou reduzida, condizente com os níveis de fosforilação reduzido de ERK1/2.

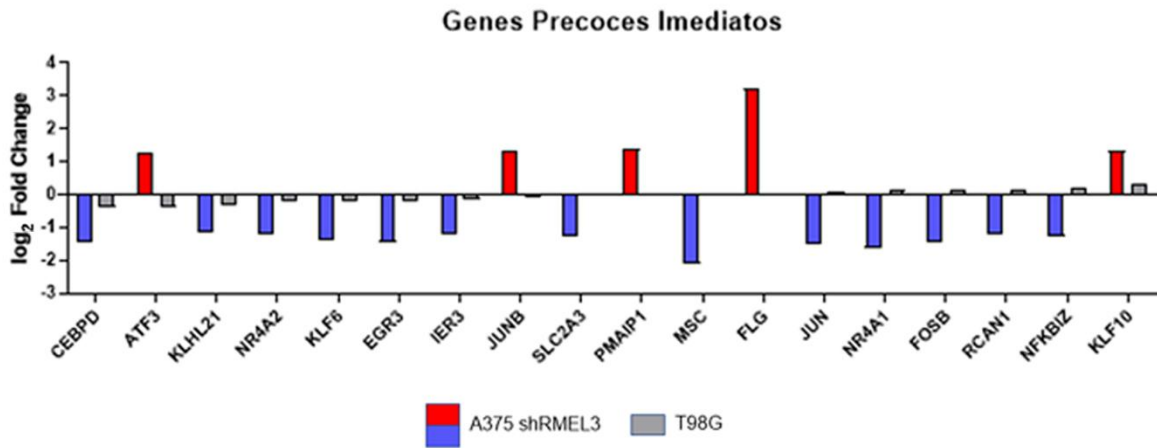
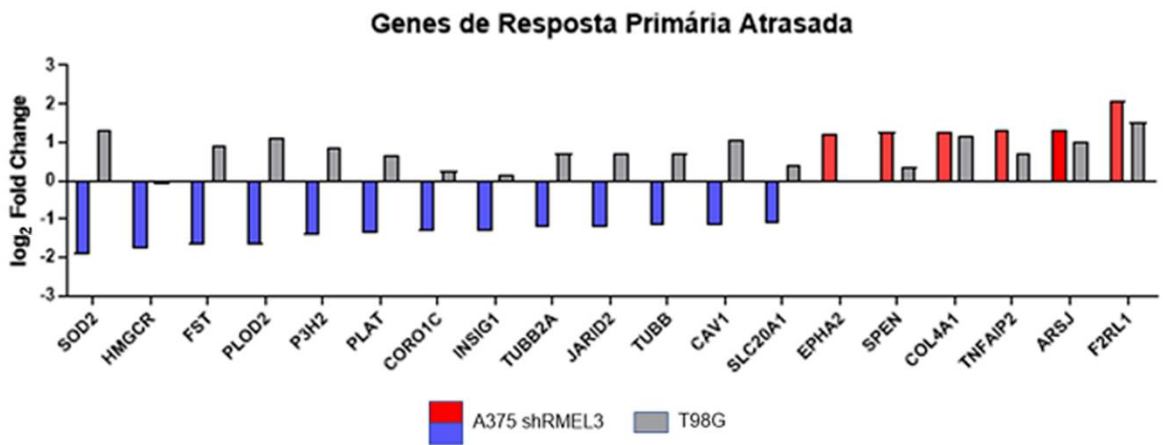
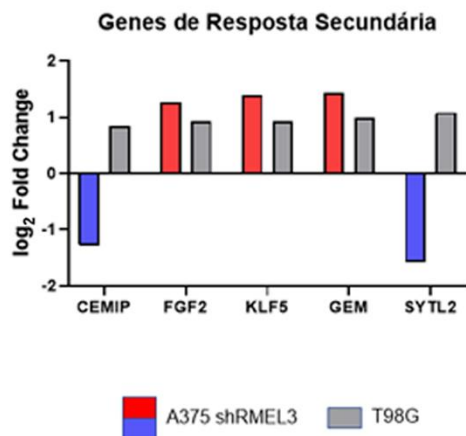
A**B****C**

Figura 43 – Genes relacionados com o programa transcripcional induzidos pela resposta a fatores de crescimento regulados após silenciamento de RMEL3 nas células A375. As células A375 shRMEL3 #4 e controle shLacZ foram estimuladas por 4 horas com 10% de soro fetal bovino, depois o RNA foi extraído para análise por sequenciamento em larga escala. Representação gráfica dos genes alterados e do Log₂ Fold Change em: (A) Os genes precoces e imediatos alterados nas células A375 shRMEL3 #4 comparados com os da célula de glioblastoma T89G.; (B) Genes de resposta primária atrasada e em (C) genes de resposta secundária.

A principal via proliferativa e/ou sobrevivência enriquecida em nossas análises dos DEGs foi a de PI3K-AKT (Figura 39), e quando avaliamos todos os genes regulados por RMEL3, vemos a regulação da via desde sua ativação, com a superexpressão do fator de crescimento PDGFG (GF) e componentes da matriz extracelular, além das integrinas alfa (ITGA4 e ITGA8) que provêm a ativação de PI3K, e a redução na expressão dos receptores tirosina quinase ERBB3 e PDGFRB, assim como receptores GPCR, como os LPAR2 e LPAR4 comentados anteriormente, receptores que podem levar a ativação desta via (Figura 41). A jusante, tem o aumento de expressão de membros da família PI3K classe I e a redução da expressão da fosfatase PP2A, que atua desfosforilando AKT. Efeitores que promovem alguns dos desfechos da sinalização de PI3K também foram regulados, como eIF4B, PEPCK, p27Kipl, BIM e BCL2 (Figura 44). Apesar de não aparecer enriquecidas nas análises de GO e KEGG, muitos genes relacionados diretamente ou alvo das vias de MAPK foram regulados no silenciamento de RMEL3. Proteínas da família DUSP, conhecidas inibidores de MAPK, aparecem reguladas nas células estudadas, tanto positivamente como DUSP10, DUSP14 e DUSP16, como negativamente como DUSP3, DUSP4 e DUSP18 (Tabela Suplementar 5).

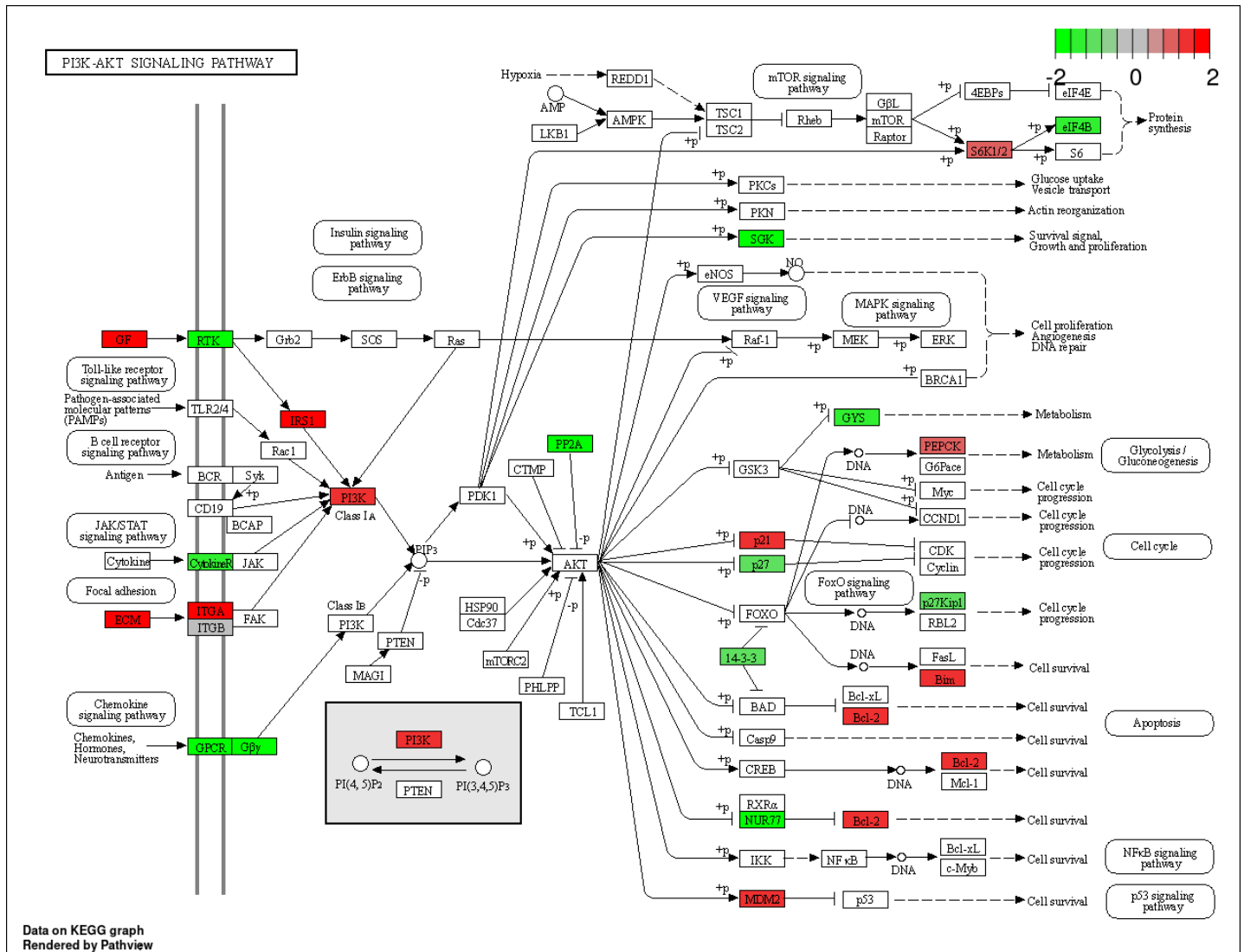


Figura 44 - Mapa da via de sinalização de PI3K-AKT (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.

Quando analisamos mais a fundo os genes regulados após o silenciamento de RMEL3 e que estão relacionados ao ciclo celular, identificamos 77 genes regulados negativamente e 26 regulados positivamente (Tabela Suplementar 7). Nos genes regulados negativamente, grande parte participa da transição da fase G2 para M, como as ciclina B1 e B2 (CCNB1 e CCNB2) e os inibidores de CDK-ciclina (CDKN2C que codifica p18Ink4C, CDKN3 e CDKN1B que codifica p27); e CDC25C, que promove a defosforilação ativadora das CDK-ciclina. Importantes genes envolvidos nos pontos de checagem G2/M (CDC25C, AURKA, BUB1 e BUB3) e no ponto de checagem do fuso mitótico (PK1, UBEC2, SPAG5 e CENPF) estão regulados negativamente após o silenciamento de RMEL3. Grande parte dos genes regulados positivamente e participantes do ciclo celular atuam na transição entre as fases G1 e S, como o inibidor

de CDK-ciclina CDKN1A, que codifica a p21, além de RRM2, MCM5, E2F5 entre outros. Importantes proteínas do checkpoint G1/S estão superexpressas nas células A375 shRMEL3, como a proteína do retinoblastoma (RB1), regulador chave da transição G1/S, além de RFC2, MDM2 e CDC16. No mapa via “KEGG Cell Cycle” (Figura 45) é possível visualizar o momento em que esses os genes regulados no silenciamento de RMEL3 estão atuando.

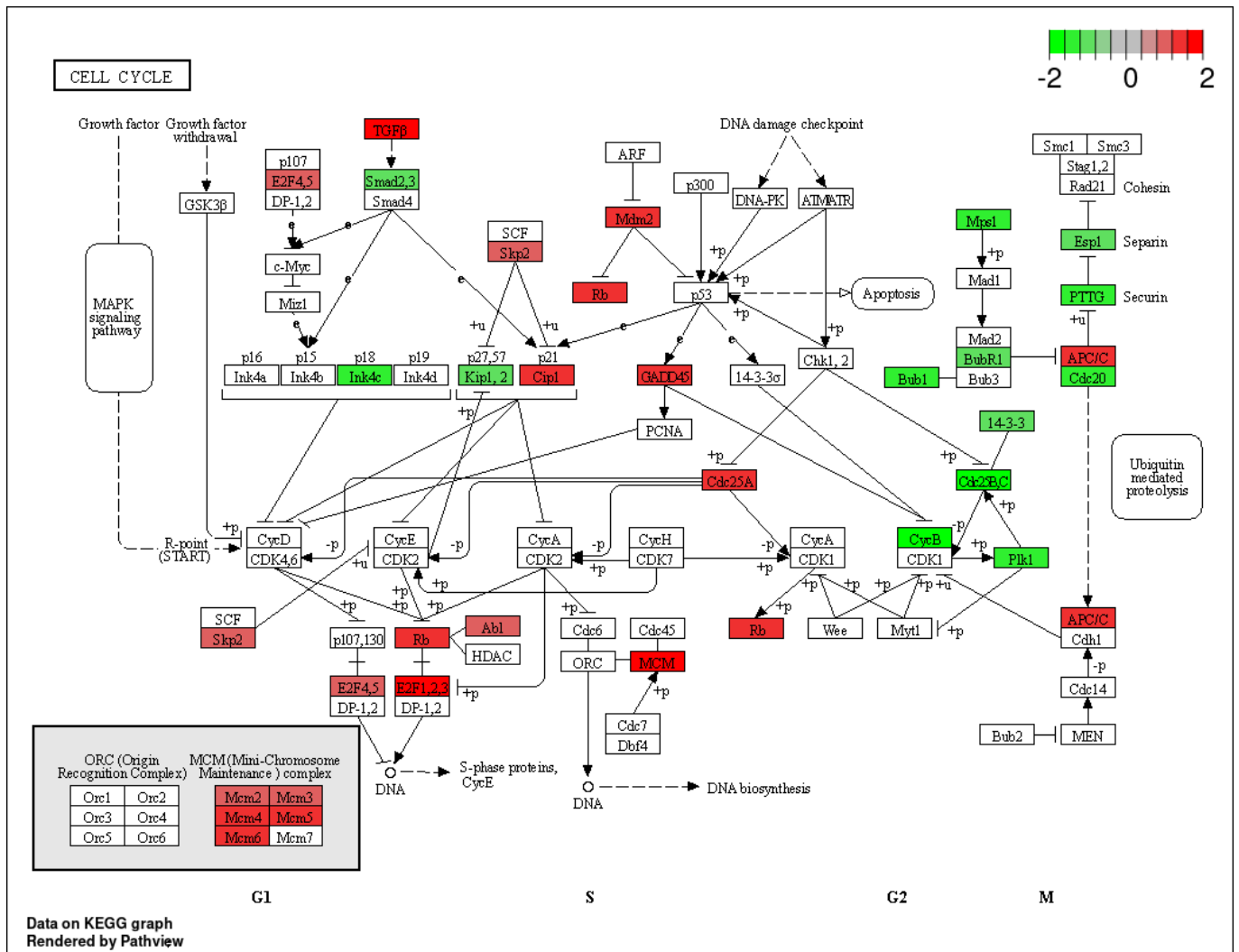


Figura 45 – Mapa da via Ciclo Celular (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.

Foram detectados 44 genes de adesão focal, adesão célula-célula e interação célula-matriz celular após o silenciamento. Proteínas central da via de adesão focal, como RhoGAP, VASP, ILK e Rac tem a expressão reduzida, enquanto a talina, vinculina, PIP5K, ROCK e MLC estão superexpressas em nossas células de estudo (Figura 44). Os genes de componentes de matriz extracelular como ZP4, FBLN5 e MATN2 (Tabela Suplementar 5) estão drasticamente reduzidos nas células estudadas. Genes de adesão célula-célula como NRCAM, NFASC tiveram uma expressiva redução em nossas células silenciadas, enquanto as integrina ITGA8 e ITGA1 e SERPINE1, genes de adesão celular, estão superexpressos (Figura 44). A maioria dos genes superexpressos participantes da via de adesão focal pertencem a superfamília de colágenos (COL), sendo o COL4A6 o mais superexpresso. Os genes com aumento mais expressivo relacionados a adesão focal e adesão célula-célula foram os genes supressores de tumor DCC e UNC5D (Tabela Suplementar 7 e Figura 46).

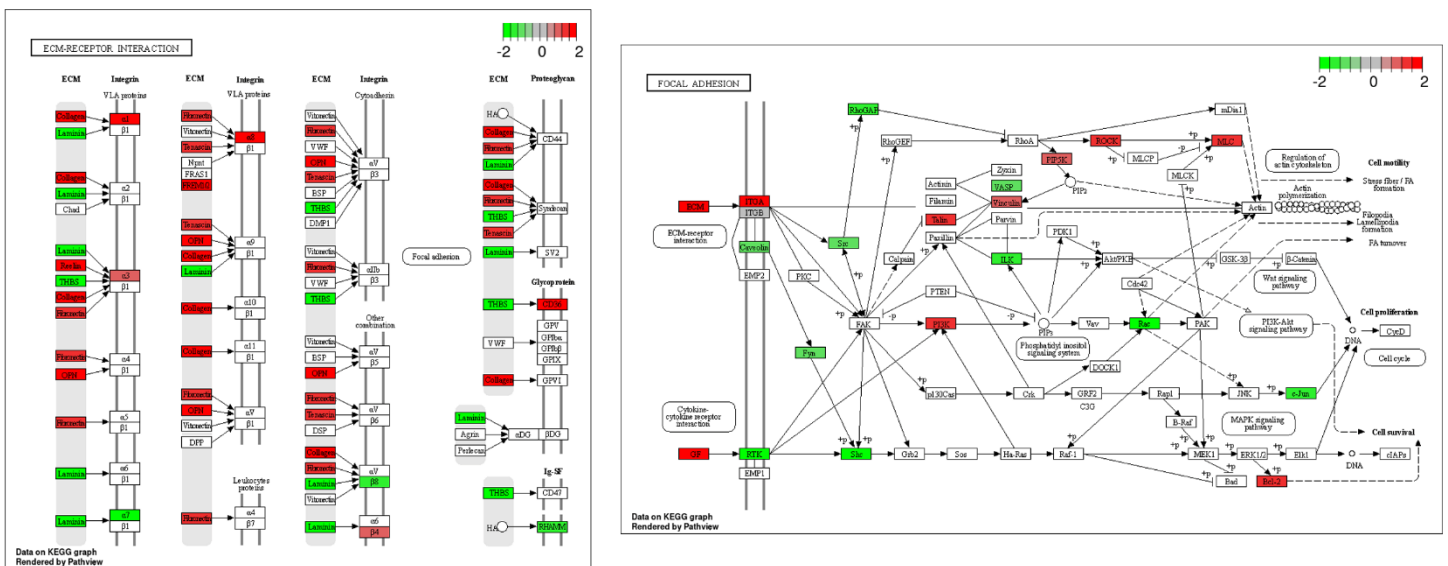


Figura 46 - Mapas das vias Interação de receptores com a matriz celular e Adesão Focal (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.

Como visto pelos ensaios de captação de glicose e detecção de lactato (Figura 28), o metabolismo das células de melanoma após o silenciamento de RMEL3 é alterado. Algumas vias metabólicas apareceram enriquecidas na análise com os genes regulados da A375 shRMEL3 (Figura 38 e 39). Dentre as vias encontradas para os genes regulados, muitas interagem com vias metabólicas envolvendo processamento de aminoácidos, lipídeos e carboidratos (Tabela Suplementar 7). Genes da via da glicólise/gliconeogênese

como o da enzima glicolítica GPI, do transportador de glicose-6-fosfato SLC37A2 e o da fosfofrutoquinase PFKFB4 são negativamente regulados nas células silenciadas para RMEL3 (Figura 47). O gene da enzima PCK2 (fosfoenolpiruvato carboxicinas 2), responsável por produzir glicose a partir do lactato e outros precursores derivados do ciclo do ácido cítrico, juntamente com o da hexoquinase HKDC1 e da glucosaminafosfato isomerase GNPDA2 estão superexpressos nas células estudadas (Tabela Suplementar 4 e 7). Um dos genes que apresentou redução de expressão expressiva foi o FOLH1 (Tabela suplementar 4), uma glicoproteína transmembrana tipo II pertencente à família M28 peptidase que atua na processo metabólico e proteólise de compostos contendo ácido fólico e biossíntese de bases nitrogenadas.

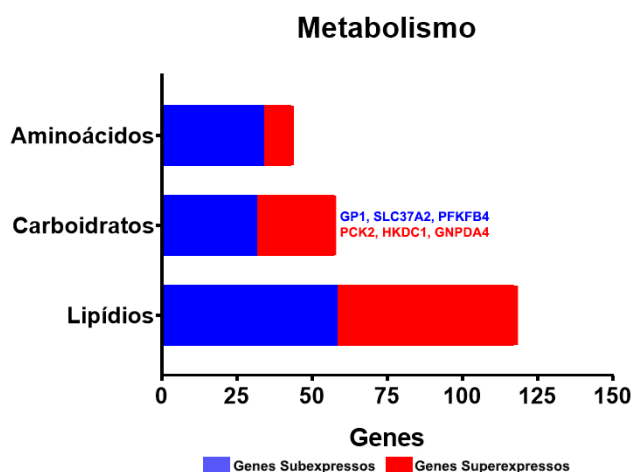


Figura 47 – Distribuição dos genes regulados no silenciamento de RMEL3 no metabolismo dos principais componentes celular. Em destaque na coluna de metabolismo de carboidratos estão os genes subexpressos (azul) e superexpressos (vermelhos) da via da glicólise.

Vários genes regulados participam da via de Senescência Celular, importante via supressora tumoral. Muitos foram citados anteriormente, pois participam do ciclo celular e da via de PI3K-AKT e promovem a senescência replicativa (Figura 43 e 44). Genes da via ativados por estresse celular e que promovem a senescência parácrina, senescência associada ao fenótipo secretor, apareceram regulados: ZFP26L1, TGF β e PAI1 são superexpressos, e TRPV4, IP3R, IL1 α , NFTA e IGFBP3 são reduzidos (Figura 48)

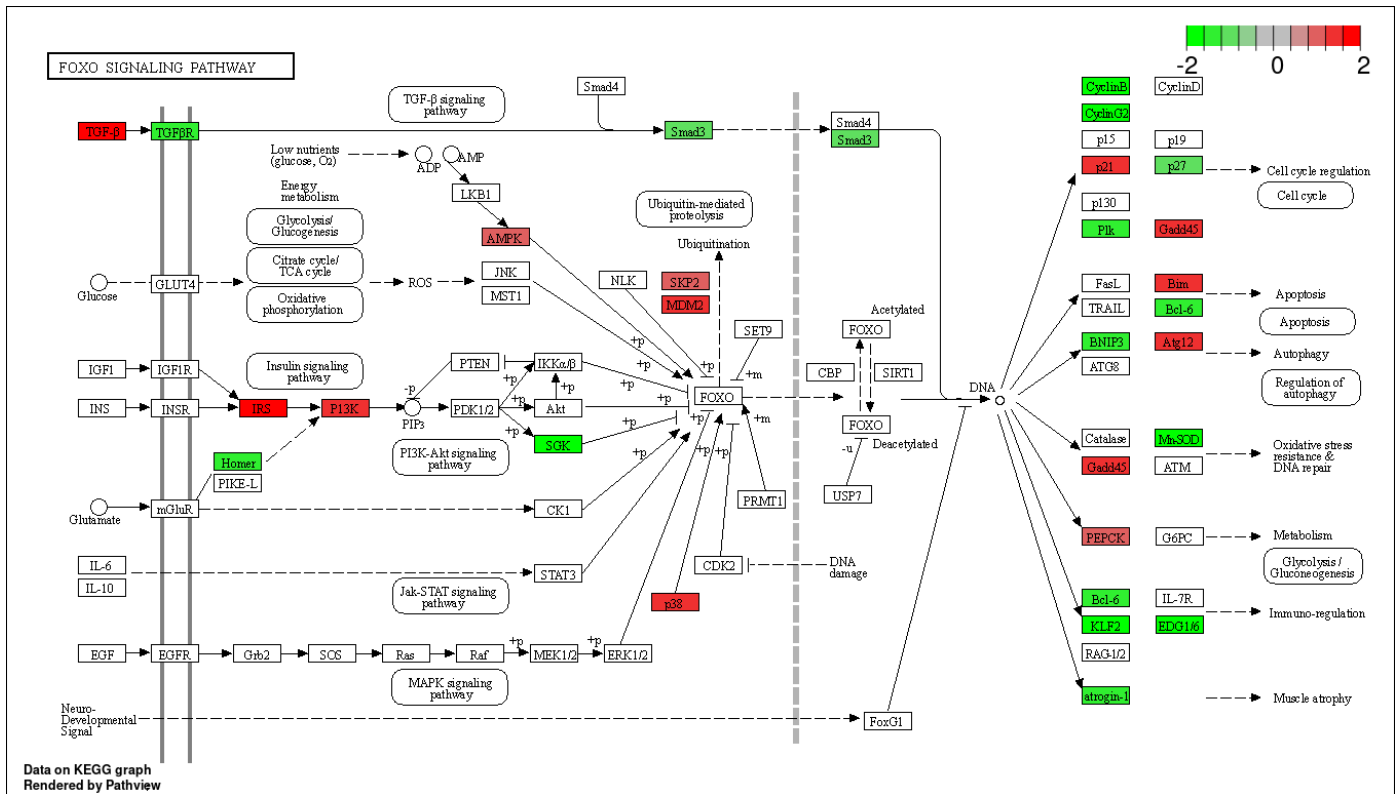


Figura 49 – Mapas da via supressora tumoral FOXO (KEGG) com indicação dos genes que foram regulados no silenciamento de RMEL3. Em verde estão destacados os genes regulados negativamente e em vermelho os genes regulados positivamente nas células de A375 silenciadas para RMEL3.

4.5.5 RMEL3 pode estar modulando a expressão de genes localizados na mesma região cromossômica

Com intuito de verificar se o próprio RMEL3 estaria atuando na transcrição de genes próximo ao locus, observamos que outros genes da região q11.2 do cromossomo 5, região onde está localizado o locus do RMEL3, também apresentaram mudança na expressão. Nesta região tem cerca de 103 genes anotados (Figura 50A – Genoma Browser), sendo 38 genes codificante de proteínas e 65 genes de lncRNA. 56 genes foram detectados no RNAseq, entretanto a alteração de expressão de grande parte desses genes não foi significativa, mas 13 desses genes tiveram, pelo menos, p-value < 0,05 apesar de nem todos terem o FDR p-value < 0,05. Seis genes localizados antes e seis depois do RMEL3 na posição chr5 q11.2 foram regulados após o silenciamento: a integrina ITGA1, do lncRNA AC027329.1, da folistatina (FST), o fator de ribosilação ADP como GTPase 15 (ARL15), a fosfatase lipídica 1 (PLPP1), o receptor A de IL31 (IL31RA), da proteína 2 semelhante à β-actina (ACTBL2), do lncRNA LINCR-0003, da polo quinase 2 (PLK2),

da fosfodiesterase 4D (PDE4D), do domínio DEP contendo 1B (DEPDC1B) e da proteína de membrana SMIM15 (Figura 51B).

Nove genes vizinhos de RMEL3 foram regulados negativamente e três positivamente. Os genes localizados mais próximos a RMEL3, como PLPP1 e IL31RA antes, ACTBL intrônico ao RMEL3, e LINCR-0003, PLK2 e PDEAD após, estão com a expressão reduzida na ausência de RMEL3. Esses genes estão localizados a no máximo 2 milhões de pares de bases de distância do início ou final do locus de RMEL3, o que pode indicar que os transcritos de RMEL3 observados no núcleo (Figura 17 e 18) podem ter função de modular os programas de transcrição em locus adjacentes, e no seu próprio locus, já que um ACTBL2 está localizado no íntron 1 do transcrito RMEL3_201 (Figura 4). A redução de ACTBL2, apesar de não ter sido significativa, pode estar diretamente relacionada com a redução da capacidade migratória e invasiva das células A375 shRME3, pois foi provado recentemente que esse gene codifica a sétima isoforma da actina e é essencial para a motilidade celular das células de melanoma A375 (Malek et al., 2021).

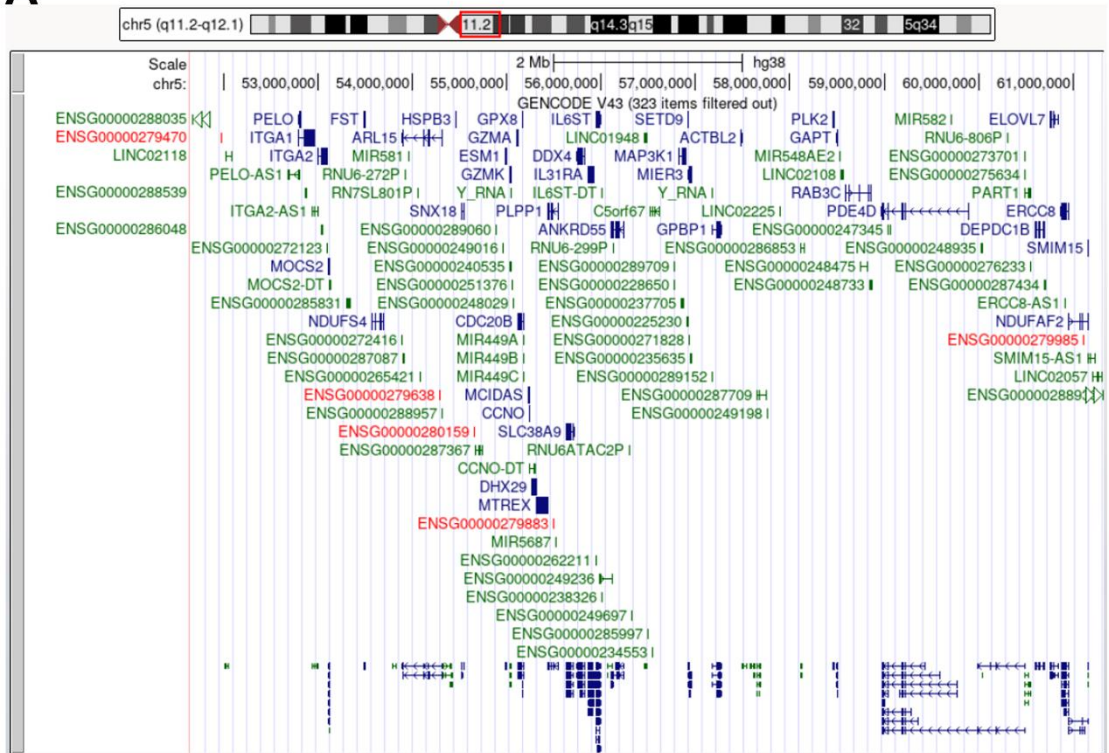
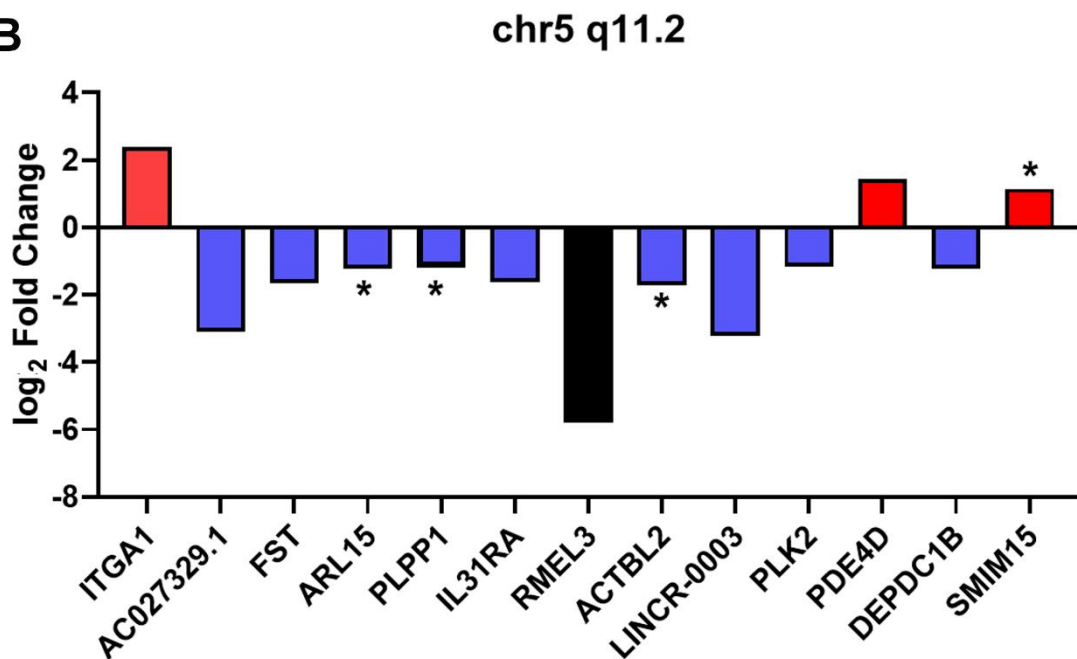
A**B**

Figura 50 – Genes localizados no cromossomo 5 q11.2 regulados por RMEL3. (A) Em destaque os genes anotados para a região q11.2 do cromossomo 5, a região onde está localizada o RMEL3. Em verdes são os lncRNAs e miRNA, em azul os genes codificantes e em vermelho genes não caracterizados. **(B)** Genes codificantes e de lncRNA do chr5 q11.2 regulados por RMEL3. * indica genes com p-value <0,05, mas com FDR p-value >0,05.

5. Discussão

A incidência do melanoma cutâneo vem aumentando nas últimas décadas e sua letalidade é altíssima quando não diagnosticado precocemente. A terapia alvo com inibidores de quinases como BRAF e MEK e a imunoterapia revolucionaram o tratamento do melanoma cutâneo metastático, entretanto existe uma parcela considerável dos doentes que não respondem ao tratamento por não terem os alvos moleculares ou por adquirirem resistência adaptativa após a terapia (Lim et al., 2017). Tendo em vista o cenário atual da doença, faz-se necessário a identificação de moléculas e mecanismos que possam ser utilizados de maneira diagnóstica ou como alvos de terapia. Nos últimos anos, os RNAs longos não codificantes despontaram nas pesquisas relacionadas à biologia do câncer, por serem moléculas de expressão específica, seja tecido-específica ou condição-específica (Diamantopoulos et al., 2018). Em melanoma foram identificados 246 lncRNA diferencialmente expressos, com funções diversas como regulação da transcrição, estabilização de mRNA, interação com proteínas e outras (Melixetian et al., 2022).

Foi com o intuito de caracterizar genes diferencialmente expresso em melanoma, que em 2010 nosso grupo iniciou a caracterização de três lncRNAs com expressão enriquecida em melanoma (Sousa et al., 2010). Um desses lncRNA é o RMEL3, alvo do atual estudo. Hoje já se sabe que a expressão de RMEL3 em melanoma está associada com a mutação BRAF^{V600E} e que sua expressão é necessária para sinalização de MAPK e PI3K (Goedert et al., 2016). A superexpressão de RMEL3 em fibroblastos imortalizados e células de melanoma aumentou a proliferação e sobrevivência sob privação de soro, capacidade clonogênica e crescimento de tumor de melanoma xenoenxertado (Cardoso et al., 2019). Neste trabalho, confirmamos a influência de RMEL3 em fenótipos tumorais e a interação do lncRNA com importantes proteínas das vias de MAPK e Hippo. Descrevemos transcritos diferentes oriundos do locus de RMEL3 na linhagem de melanoma BRAF^{V600E} A375, e a localização subcelular desses transcritos. Por fim, analisamos o perfil de expressão das células A375 silenciadas para RMEL3 em comparação com controle após estimulação das vias de proliferação e sobrevivência com fatores de crescimento.

Um primeiro requisito para a categorização funcional de um lncRNA é um catálogo sistemático de transcritos desse lncRNA e sua expressão nos tecidos. Para o RMEL3 canônico, hoje anotado como RMEL3_201, nosso grupo analisou sua expressão específica em vários tecidos tumorais e não tumorais, bem como em linhagens de

melanoma e melanócito, e comprovou sua expressão específica em melanoma (Cardoso et al., 2019; Goedert et al., 2016; Sousa et al., 2010). Como no início da caracterização do RMEL3 somente um transcrito estava anotado em bancos de dados do transcriptoma humano, por um tempo nossas análises se concentraram no transcrito RMEL3_201. Entretanto, atualmente um conjunto maior de transcritos de confiabilidade variável ou desconhecida e que pode não estar bem definida está associado ao locus de RMEL3 (Figura 4). A fim de melhorar a anotação dos transcritos RMEL3, iniciamos a caracterização desses transcritos na linhagem A375.

Nas células A375 além do canônico RMEL3_201, identificamos oito transcritos diferentes. Quatro deles eram versões alternativas do canônico com adição de um éxon alternativo entre os éxons 1 e 2. Esse éxon alternativo é o éxon inicial do RMEL3_202, que aparece em diferentes tamanhos nos T-A375_3, 4, 5 e 6 (Figura 10 e 16). O transcrito RMEL3_202 como anotado não foi detectado na A375. Uma peculiaridade observada na A375 é que em todos os transcritos o éxon 3 de RMEL3_201 possui uma deleção de 45 nt no início 5' do éxon (Figura 16) e que foi confirmada pelos dados de expressão de A375 disponíveis em bancos de dados (Figura 15). Essa deleção que não foi observada em outras linhagens de melanoma, como a WM208 (Cardoso et al., 2019) e quando chegamos os dados de expressão de RNAseq das células SKMEL-5 do ENCODE.

Duas isoformas com o final 3' completamente novos foram encontradas e descritas nesse trabalho, os transcritos T-A375_8 e 9, onde no primeiro o final 3' é uma extensão do éxon 3 e o segundo é um éxon não descrito anteriormente localizado no íntron localizado entre os éxon 1 e 2 do RMEL3_201 (Figura 15 e 16). O final 5' de RMEL3_201 foi elucidado durante nosso estudo, e agora sabemos que ele possui uma extensão de 26 nt no final 5' e que esse início é comum em todos os transcritos iniciados por esse éxon (Figura 14-16). Por fim, outro transcrito completamente desconhecido foi encontrado neste trabalho, o T-A375_7 iniciado por um éxon *upstream*, seguido do éxon 2 e 3, mas com o final 3' ainda desconhecido (Figura 16).

Ao confrontar nossos achados com dados de sequenciamento em larga escala de linhagens A375 e SKMEL5 do ENCODE, verificamos a existência de expressão dos éxons encontrados em nossos experimentos, validando a existência dos mesmos (Figura 15). A variedade de transcritos encontrados para o locus de RMEL3 está relacionada com a complexidade dos loci de lncRNA. Uma infinidade de isoformas de lncRNA surge da combinação de vários locais de início da transcrição, locais alternativos de clivagem e poliadenilação, bem como eventos de splicing alternativos. Os lncRNAs têm splicing

substancialmente mais alternativo do que os mRNAs, o que aumenta ainda mais a variabilidade dos transcritos. (Deveson et al., 2018). Além de abrigar os transcritos de RMEL3, o locus também tem o gene da ACTBL4 e do pseudogene SALL4P1. Essa é uma característica de lncRNA, já foi demonstrado que os lncRNAs abrigam outros RNAs não codificantes, como snoRNAs, miRNAs ou tRNAs, ou contêm genes codificadores de proteínas intrônicas, aumentando a complexidade potencial dos loci do lncRNA (Kornfeld et al., 2017).

Os lncRNAs podem ser em grande parte nucleares, onde alguns estão concentrados em subestruturas nucleares, em grande parte citoplasmáticos, ou existem comparativamente em compartimentos nucleares e citoplasmáticos (Yao et al. 2019). Em comparação com os mRNAs, que são amplamente citoplasmáticos, os lncRNAs têm uma distribuição mais diversa, como parece ser o caso do RMEL3 que possui uma distribuição ao longo da célula, com grande parte localizada no citoplasma, e no núcleo o lncRNA aparenta estar acumulado nas regiões dos nucléolos (Figuras 16, 17 e 18). A variedade de transcritos de RMEL3 encontrado parece ser a causa da ampla distribuição ao longo da célula, pois se sabe que o extenso *splicing* alternativo de lncRNAs tem o potencial de diversificar ainda mais o resultado funcional de um lncRNA por meio de padrões de localização diferencial (Bridges et al., 2021). Os transcritos de RMEL3 localizados no núcleo, aparentemente no nucléolo, podem estar envolvidos nas funções clássicas de lncRNA nucleares, como a modulação dos programas de transcrição por meio de interação e remodelamento da cromatina (Mas-Ponte et al., 2017). Já os transcritos citoplasmáticos, poderiam estar mediando vias de transdução de sinal, programas de tradução e controle pós-transcricional da expressão gênica, através do sequestro de miRNA e proteínas afim de regular seus níveis e/ou atividade (Sarropoulos et al., 2019).

Validamos a interação de RMEL3 com três proteínas candidatas identificadas anteriormente pelo grupo (Figuras 33, 34 e 35). Todas as proteínas estudadas estão localizadas no citoplasma, o que corrobora a função do RMEL3 mediando vias de transdução de sinal através da interação de proteínas envolvidas. A primeira proteína validada foi a ARAF (Figura 31, 33, 34 e 35), que é uma das proteínas da família das RAF, quinases centrais da via de MAPK. Entretanto, o papel de ARAF como quinase é coadjuvante, pois ela possui baixa atividade quinase em relação a MEK, o único substrato amplamente aceito para RAF quinases (Matallanas et al., 2011). Uma das principais atuações quinase independente de ARAF é a de promover a estabilização do complexo heterodimérico CRAF/BRAF formado após a ativação por RAS e que amplifica a

transdução de sinal, aumento assim a ativação de MEK (Rebocho & Marais, 2012). Entretanto, a interação de CRAF com a BRAF^{V600E} possui efeito oposto e inibe a atividade da oncoproteína (Karreth et al., 2009). Logo, em um melanoma BRAF^{V600E} não é interessante a atividade de ARAF dentro da via de MAPK.

Além da estabilização do heterodímero de RAFs, ARAF também tem o papel de inibição da via supressora de tumor Hippo através do sequestro e inibição a quinase pró-apoptótica MST2, componente central da via supressora de tumor Hippo (Rauch & Kolch, 2019). A interação de ARAF com MST2 impede a ativação da mesma, interrompendo assim a ativação da via de Hippo, que poderia promover a parada da proliferação por meio da inibição da via de MAK, senescência ou apoptose das células (O'Neill et al., 2004). A própria MST2 é uma proteína ligante de RMEL3 identificada anteriormente e confirmada neste trabalho (Figura 31, 33, 34 e 35) e que possui até mesmo com maior potencial de interação que a ARAF (Figuras 35). A superexpressão de RMEL3 em HEK293T aumentou a interação de MST2-ARAF (Figura 32), o que indica que RMEL3 pode estar atuando como um *scaffold* estabilizando essa interação, e mantendo tanto ARAF como MST2 impedidas de promover a inibição de BRAF^{V600E} e da via de MAPK. Trabalhos anteriores mostraram que a inibição de MST2 por ARAF e CRAF é favorável em melanomas BRAF^{V600E}, pois impede que MST2 atue inibindo a via de MAPK levando a maior proliferação e sobrevivência (Feng et al., 2017).

A terceira proteína ligante de RMEL3 validada neste trabalho foi a FAM83D (Figura 33, 34, e 35). Esta proteína é um dos oito membros de uma família de proteínas (FAM83) caracterizada por um domínio altamente conservado de função desconhecida (DUF1669). As proteínas da família FAM83 possuem a capacidade de se ligarem a CRAF e promover a sua localização da membrana (Cipriano et al., 2014). A manutenção de CRAF na membrana é importante para a ativação da mesma por RAS localizado na membrana, e sua efetiva participação na via de MAPK (D. Wang et al., 2015). A ativação de CRAF leva a formação dos heterodímeros com BRAF amparados por ARAF, como comentado anteriormente. Tendo esses caminhos de ativação em vista, hipotetizamos que a interação de RMEL3 com FAM83D atue impedindo a interação dela com CRAF, reduzindo assim a ativação de CRAF e a possibilidade de formação do complexo inibitório CRAF-BRAF^{V600E} estabilizado por ARAF.

A expressão de RMEL3 nas células de melanoma favorece a proliferação e sobrevivência por manutenção ou auxílio das MAPK e PI3K, visto que na ausência de RMEL3 as células A375 tiveram menor ativação (Figura 24) destas e por consequência

menor taxa proliferativa e sobrevivência (Figura 20-21). Quando analisamos o perfil transcricional das células silenciadas para RMEL3 mediante a estímulos por mitógenos, detectamos diversos genes de resposta a fatores de crescimento regulados negativamente (Figura 41). Muitos genes regulados por RMEL3 participam principalmente de vias e proliferação e sobrevivência como a de PI3K-AKT (Figura 42) e da via de fatores de transcrição FOXO (Figura 46), indicando que a presença de RMEL3 é importante para expressão de genes cruciais para vias proliferativas e de sobrevivência, como o fator de transcrição JUN, um conhecido oncogene que em melanoma já foi correlacionado com aumento da resistência adaptativa a inibidores de BRAF e a proliferação (Ramsdale et al., 2015).

O aumento na expressão de genes PIK3 classe I (Figura 43), indica que naquele momento a via de PI3K está sendo ativada, o que é esperado devido ao estímulo com soro fetal. Entretanto, mesmo com aumento de proteínas da via, a ativação de AKT nas células silenciadas para RMEL3 é menor do que a controle mediante a estímulo com SFB (Figura 24) e em condições normais de cultivo (Goedert et al., 2016), o que indica que mesmo que as células estejam tentando aumentar a ativação de PI3K-AKT há outros eventos celulares dependentes de RMEL3 que impedem a ativação do efetor da via.

Ainda referente a proliferação e sobrevivência, os genes de resposta a mitógenos CCL2 e SGK1 são alvos regulados por RMEL3, e estes genes já foram relacionados com maior resistência adaptativa à inibidores de BRAF e a proliferação de melanomas BRAF^{V600E} (Parkman et al., 2022; Vergani et al., 2016), reforçando mais uma vez a associação de RMEL3 com BRAF^{V600E} (Goedert et al., 2016) e manutenção da malignidade conferida por essa oncoproteína. O silenciamento e a inibição de SGK1 em células de câncer colorretal promove a redução da proliferação, migração e contribui para apoptose celular (Liang et al., 2017), fenótipo que também observado nas células silenciadas para RMEL3 (Figura 21, 25 e 26). A expressão de RMEL3 inibi o fator de transcrição dependente de AMP cíclico ATF3 (Figura 43), fator de transcrição que desempenha um papel crítico no reparo de danos ao DNA e regula a expressão, ativação ou repressão de reguladores do ciclo celular. O aumento da expressão de ATF3 contribui na supressão do crescimento celular, invasão e migração, em outras linhagens de melanoma (Zu et al., 2020), logo sua inibição promovida por RMEL3 é importante para reduzir os efeitos de ATF3 na supressão tumoral.

O aumento de células em G0/G1 observados nas A375 shRMEL3 #3 e #4 (Figura 21) pode estar relacionado com o aumento na expressão da proteína de retinoblastoma

(RB1), importante proteína do ponto de checagem de G1 responsável pela regulação do avanço do ciclo celular da fase G1 para S através da regulação negativa dos fatores de transcrição E2F (E2Fs) e quinases dependentes de ciclina (CDKs) (Di Fiore et al., 2013) e da p21 (CDKN1A), inibidor bem conhecido do ciclo celular que pode interromper a progressão do ciclo celular nas transições G1/S e G2/M inibindo CDK4,6/ciclina-D e CDK2/ciclina-E (Karimian et al., 2016) (Figura 43). A expressão aumentada destes genes juntamente com a redução de genes da transição da fase G2/M, como as ciclinas B1 e B2 e dos inibidores de CDK-ciclinas p18^{Ink4C} e p27 (Figura 43) e a redução do número de células A375 shRMEL3 em G2/M (Figura 21), nos indicam que o silenciamento de RMEL3 promove a parada ou atraso do ciclo celular das células A375, afetando a proliferação da mesma (Figura 21).

Dados anteriores do grupo já indicavam que a expressão de RMEL3 associado à supressão da apoptose (Goedert et al., 2016; Cardoso et al., 2019). Nesse trabalho vimos que a ausência de RMEL3 aumentou a apoptose celular nas células A375 tanto na presença de mitógenos (Figura 24) quanto na ausência (Figura 25). Ao buscar genes apoptóticos regulados por RMEL3, encontramos que como gene altamente aumentado no silenciamento de RMEL3 o MEGF10, que codifica uma proteína transmembrana tipo I altamente expressa no sistema nervoso central, que em melanoma uveal demonstrou ter papel crucial na inibição da progressão tumoral além de aumentar a apoptose celular (Yang et al., 2021). A expressão de MEGF10 é reprimida epigeneticamente pela hipermetilação do DNA ou pela metilação H3K27/K9 em linhas celulares de neuroblastoma e de melanoma uveal (Charlet et al., 2017; Soltysova et al., 2023), e pode ser por esse mecanismo que RMEL3 reprime a expressão de MEGF10 em A375, visto que análises anteriores do nosso grupo demonstraram alta expressão de RMEL3 correlaciona com uma hipermetilação do genoma em melanoma (Goedert, 2019).

Outra proteína relacionada com a apoptose e que tem expressão aumentada nas células silenciadas para RMEL3 é a CHOP10. Esta proteína que é frequentemente considerada o principal executor do apoptose a jusante do estresse irrecuperável de retículo endoplasmático ativado pela via de resposta a proteínas mal enoveladas (UPR) (Walter & Ron, 2011). A via de UPR tem sido identificada como um fator chave na progressão e metástase de cânceres, notadamente o melanoma. CHOP10 regula a expressão de quatro membros da família de proteínas BH3, dentre elas a BIM, proteína pró-apoptótica regulada positivamente no silenciamento de RMEL3, e inibe a atividade da proteína anti-apoptótica BCL2 (Li et al., 2015).

BIM também promove a morte celular após a retirada de fatores de sobrevivência, e na presença de fatores de sobrevivência a sua expressão é reprimida em células BRAF^{V600E}. A expressão de BRAF^{V600E} em fibroblastos embrionários de camundongos reprime BIM e protege as células da retirada do fator de crescimento, através da ativação de ERK1/2 independente de mitógenos, assim como ocorre em células de câncer BRAF^{V600E} (Wickenden et al., 2008). O que observamos nas células silenciadas é que há uma redução na ativação de ERK1/2 tanto na presença como na ausência de fatores de crescimento (Figura 24 e 36), além do aumento da expressão de BIM, o que pode explicar o aumento da morte celular observada nas células após retirada de RMEL3 (Figura 25 e 26) e indicando redução na atividade de BRAF^{V600E}.

O silenciamento de RMEL3 nas células de melanoma alterou o perfil metabólico visto tanto pela redução da captação de glicólise, liberação de lactato e lactato intracelular (Figura 27), assim como na expressão de genes relacionados com metabolismos de aminoácidos e carboidratos (Figura 38 e 45). O aumento de lactato intracelular pode ser explicado pela redução do exportador de lactato MCT5 (SLC16A4), entretanto nas condições que avaliamos a expressão gênica de nossas células, houve também a redução da enzima que catalisa a interconversão de piruvato e lactato, a LDHA, e da piruvato desidrogenase quinase PDK3 (Tabela Suplementar). São necessários mais estudos para melhor entender qual é a influência de RMEL3 no metabolismo das células de melanoma.

Sem sombra de dúvidas, a redução da capacidade migratória e invasiva foram os fenótipos mais marcantes no silenciamento de RMEL3 (Figura 27). Realizamos o experimento clássico para avaliar a atividade enzimática de duas das principais metaloproteinases relacionadas com migração e invasão, MMP2 e MM9, e vimos que houve uma maior atividade de MMP2 nas células silenciadas e uma menor de MM9 (Figura 28). O que é controverso com que encontramos na análise de expressão gênica dessas células, que mostra que MMP2 tem menor expressão nessas células (Tabela Suplementar 5).

Em busca de melhor entender o papel de RMEL3 na migração e invasão nas células estudadas, fomos olhar o efeito da expressão de RMEL3 nos alvos da via de sinalização de LPA. O LPA é uma molécula sinalizadora envolvida em diversos processos celulares, como migração, proliferação e diferenciação celular. A primeira função descrita para o LPA foi na motilidade celular em 1993, quando os pesquisadores identificaram o LPA como a principal molécula do soro fetal de vitelo que ativa a invasão celular, via ativação de receptores acoplados à proteína G (GPRs), que posteriormente

foram renomeados de LPARs (Imamura et al., 1993). O que observamos foi que RMEL3 regula vários genes da via de LPA e Rho, uma das principais vias a jusante (Figura 42). Um dos elementos com expressão mais regulada por RMEL3 foi a ATX, é uma das principais enzimas geradoras de LPA via conversão de LPC. Ela foi identificada pela primeira vez no melanoma maligno como um fator quimiotático necessário para a invasão do melanoma (Stracke et al., 1992), e atualmente sabe-se que as células de melanoma possuem alta expressão de ATX, o que promove a motilidade/invasividade do melanoma e aumenta o potencial metastático (Jankowski, 2011). O controle transcricional de ENPP2 ainda não está inteiramente elucidado, entretanto alguns fatores de transcrição (FT) já foram descritos como ativadores da transcrição de ATX, como v-JUN, NFAT1 e IL1B (Samadi et al., 2011) e todos são regulados pela expressão de RMEL3 (Figura 38B). O aumento de expressão de ATX também confere ao melanoma a alta capacidade de hidrolisar a LPC e aumentar os níveis de LPA no ambiente tumoral, o que tem dupla função pois aumenta o potencial migratório das células via LPA e reduz a presença de LPC que atuaria inibindo a formação de complexos de adesão focal (Ross et al., 2016).

Os receptores LPAR4 e LPAR2 são reduzidos na ausência de RMEL3, o nos leva acreditar que estas células além de reduzirem a conversão de LPC em LPA via ATX, também são menos sensíveis a LPA. O LPAR4, juntamente com o LPAR5, são os receptores de LPA comumente superexpressos em melanoma em comparação aos demais receptores (Willier et al., 2013). Estudos mostraram que LPAR2 e LPAR5 desempenham um papel importante no aumento da quimiorresistência de células A375 tratadas com drogas anticancerígenas (Minami et al., 2019). A função do LPAR4 depende do tipo de célula, por exemplo, em células de câncer de colón a expressão de LPAR4 atenuou a motilidade e a formação de colônias, enquanto o contrário foi observado em células de fibrossarcoma, onde a expressão de LPAR4 promove invasão celular e formação de invadopódio via sinalização cAMP/EPAC/Rac1 (Y. H. Lin et al., 2021). Em melanoma, pouco se conhece da função deste receptor.

Os efeitos da redução da via de LPA e Rho também podem ser observados pela alteração na expressão de diversos genes de regulação do citoesqueleto de actina e migração (Figura 42 C e D). A migração celular depende principalmente da reorganização dinâmica do citoesqueleto de actina controlada por numerosas proteínas de ligação à actina (ABP, do inglês *actin-binding proteins*) (Lambrechts et al., 2004). Diversas ABPs tiveram a expressão regulada por RMEL3 (Figura 42C), entre elas a gelsolina, uma proteína modeladora de actina que interage especificamente com ACTBL2 em células de

melanoma (Mazur et al., 2016). O gene ACTBL2 compartilha o mesmo locus gênico de RMEL3, localizado no íntron 1 de RMEL3_201 na fita oposta (Figura 4) e que apresentou uma tendência de redução de expressão quando o RMEL3 é silenciado (Figura 50), o que pode indicar que RMEL3 tenha função de modular os programas de transcrição em locus adjacentes. Recentemente foi demonstrado que mesmo que ACTBL2 esteja presente em um nível muito baixo nas células de melanoma, sua eliminação influencia significativamente na motilidade celular em células A375 (Malek et al., 2021).

Os resultados de expressão gênica das células A375 silenciada para RMEL3 nos trouxe uma nova frente de estudo para o lncRNA: o RMEL3 como regulador da evasão imune nas células de melanoma. Isso se deve pela quantidade de genes imunes e importantes para a regulação da imunogenicidade do melanoma que são regulados por RMEL3 (Figuras 39 e 40). Um exemplo é o ATX comentado acima. Além do papel na migração, a via de LPA vem sendo associada nos últimos anos com a resposta imunológica. O ATX secretado por células de melanoma eleva os níveis de LPA do microambiente tumoral e juntos ATX/LPA são quimiorrepulsivo para TILs e células T CD8⁺ circulantes (Matas-Rico et al., 2021). Os níveis altos de LPA no estroma tumoral ativa a sinalização de LPAR5 em linfócitos, regulando negativamente a sinalização do receptor de células T CD8 e a função efetora (Y. H. Lin et al., 2021), o que leva os pesquisadores a olharem para a via de LPA como um novo alvo terapêutico.

A modulação de genes de resposta imune foi muito além de ATX. Muitos dos DEGs regulados negativamente após o silenciamento de RMEL3 são genes relevantes para as células imunes, como os componentes do MHC de classe II e LAG-3 (Figura 38), indicando pela primeira vez em nossos estudos o papel de RMEL3 na resposta imune. Na ausência de uma resposta inflamatória local, a expressão das moléculas do MHC de classe II é restrita principalmente às células hematopoiéticas e ao epitélio do timo. No entanto, certos tumores, como o melanoma, podem adquirir expressão constitutiva aberrante do MHC de classe II (Axelrod et al., 2019). Estudos mostram que a expressão aberrante de moléculas do MHC de classe II em melanoma leva a ativação de células T CD4⁺ específicas do tumor que provocam uma resposta inflamatória local dominada pelo TNF que, por sua vez, inibe o CD8⁺ citotóxico (Donia et al., 2015). A expressão de MHC de classe II por melanomas foi descrita como necessária para a apresentação do antígeno tumoral e pode prever a resposta à terapia anti-PD-1 (Johnson et al., 2016).

O ligante natural de MHC de classe II LAG-3 é comumente expresso na superfície de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ e inibe o microambiente imunológico do tumor afetando

negativamente a proliferação de células T e induzindo a exaustão de células T (Long et al., 2018). A interação LAG-3 com MHC II LAG-3 em células de melanoma reduz a apoptose, seja ela induzida via Fas, por drogas ou espontânea (Hemon et al., 2011). Atualmente, o LAG-3 é considerado um ponto de controle imunológico promissor ao lado de PD-1 e CTLA-4, e atualmente já vem sendo utilizado como alvo para a imunoterapia em melanoma (Long et al., 2018).

Além da via de MHC de classe II e ATX, RMEL3 regula outros genes responsáveis pela ativação de linfócito T, genes que promovem ativação de neutrófilos mediante a resposta imune, vários elementos do sistema imune inato, proliferação de células B e apresentação de antígeno por via de MHC de classe I (Figura 40). Da classe de HLA de classe I, os HLA-A, HLA-B, HLA-C e HLA-E tem a expressão modulada de alguma maneira por RMEL3, e hoje sabe-se que a expressão destes genes está associada com baixa sobrevida de pacientes com melanoma (Dhall et al., 2020). Entretanto, estudos recentes mostram que nível de expressão do HLA classe I (sozinho ou em combinação com valores de densidade de células T) é considerado como um biomarcador preditivo de resposta ao ipilimumabe, um anticorpo monoclonal anti-CTLA-4 indicado para o tratamento de alguns tipos de melanoma metastático (Ladányi et al., 2020)

O melanoma caracteriza-se por ser um tumor altamente imunogênico, entretanto as células de melanoma desenvolveram mecanismos de escape imune, baseados na atenuação da resposta do microambiente tumoral. A expressão de RMEL3 pode estar intrinsecamente relacionada com um dos principais mecanismos de evasão imune do melanoma que é o impedimento de uma ativação ideal de linfócitos infiltrantes de melanoma, através da inibição da função dos linfócitos T citotóxicos seja pela regulação positiva de ligantes do ponto de verificação imunológico ou estimulando as populações de células imunossupressoras, como células supressoras derivadas de mieloides ou linfócitos T reguladores (Albrecht et al., 2023; Morante et al., 2022), isso mediante a regulação da expressão de ATX, MHC de classe II e LAG-3. Dados previos mostram que há uma redução da expressão de RMEL3 em células de melanoma tratadas com inibidores de BRAFV600E (Cardoso et al., 2019), o que pode ser o causador do aumento da imunogenicidade do tumor que já constada como efeito do tratamento com esses inibidores (Braicu et al., 2019).

Os resultados obtidos neste trabalho ajudam a elucidar o papel de RMEL3 nas células de melanoma BRAF^{V600E}. A redução da proliferação, sobrevivência, da migração e invasão indicam que RMEL3 participa ativamente da malignidade do melanoma através

da regulação de outras vias além sua relação com BRAF^{V600E} e PI3K vista anteriormente (Goedert et al., 2016), como a via ATX-LAP e Rho. A regulação de genes de resposta imunológica por RMEL3 abre um novo horizonte na pesquisa deste lncRNA. A regulação da expressão de genes que promovem a ativação de linfócito CD4⁺ e por consequência a redução da atividade de células T CD8⁺ no ambiente tumoral indica que RMEL3 pode ser utilizado biomarcador preditivo de resposta para imunoterapia com inibidores de checkpoints imunológicos, visto que tumores com esse tipo de microambiente tumoral não respondem às imunoterapias convencionais.

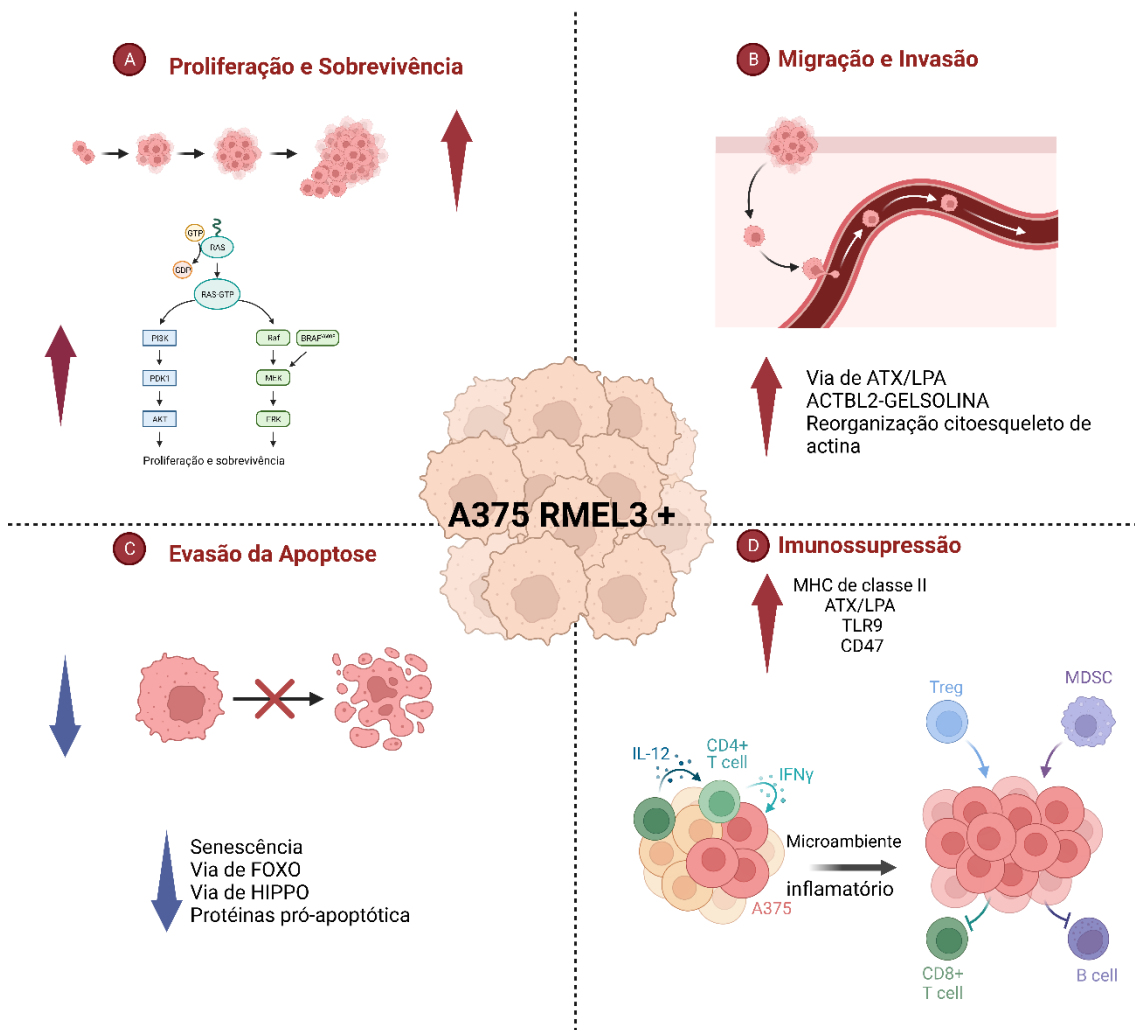


Figura 51 - Efeitos da expressão de RMEL3 nas células de melanoma A375. Ilustração criada no Biorender.com.

6. Conclusão

Através da amplificação de RMEL3 endógeno das células de melanoma BRAF^{V600E} A375, identificamos nove transcritos oriundos do locus gênico de RMEL3, além de identificar o TSS do éxon 1 do transcrito canônico. Confirmamos que os transcritos de RMEL3 estão distribuídos pelo citoplasma e núcleo das células de melanoma. A expressão de RMEL3 tem influência direta na proliferação, migração, invasão e sua ausência aumentou a apoptose, indicando que esse lncRNA participa ativamente da manutenção de importantes fenótipos tumorais em melanoma. A análise do perfil transcricional das células de melanoma silenciadas para RMEL3 mostrou a regulação de genes da via de PI3K-AKT, de ciclo celular e senescência e apoptose, corroborando a participação de RMEL3 na manutenção da malignidade do melanoma. RMEL3 regula a expressão de ATX e de todos os HLA de classe II expressos na célula de melanoma A375 e do seu ligante LAG-3, indicando um papel RMEL3 na imunogenicidade do melanoma, papel este então desconhecido para o RMEL3 e que deve ampliar o campo de pesquisas sobre esse lncRNA.

7. Referências

- Adamopoulos, P. G., Tsiakanikas, P., Stolidi, I., & Scorilas, A. (2022). A versatile 5' RACE-Seq methodology for the accurate identification of the 5' termini of mRNAs. *BMC Genomics*, 23(1), 1–14. <https://doi.org/10.1186/S12864-022-08386-Y/FIGURES/6>
- Adariani, S. R., Buchholzer, M., Akbarzadeh, M., Nakhaei-Rad, S., Dvorsky, R., & Ahmadian, M. R. (2018). Structural snapshots of RAF kinase interactions. *Biochemical Society Transactions*, 46(6), 1393–1406. <https://doi.org/10.1042/BST20170528>
- 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>
- Albrecht, L. J., Livingstone, E., Zimmer, L., & Schadendorf, D. (2023). The Latest Option: Nivolumab and Relatlimab in Advanced Melanoma. Em *Current Oncology Reports*. Springer. <https://doi.org/10.1007/s11912-023-01406-4>
- Alqathama, A. (2020). metastasis: potentials and challenges. Em *Am J Cancer Res* (Vol. 10, Número 4). www.ajcr.us/
- 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*. <http://www.translational-medicine.com/content/10/1/85>
- Axelrod, M. L., Cook, R. S., Johnson, D. B., & Balko, J. M. (2019). Biological consequences of MHC-II expression by tumor cells in cancer. Em *Clinical Cancer Research* (Vol. 25, Número 8, p. 2392–2402). American Association for Cancer Research Inc. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-18-3200>
- Azad, T., Nouri, K., Janse van Rensburg, H. J., Maritan, S. M., Wu, L., Hao, Y., Montminy, T., Yu, J., Khanal, P., Mulligan, L. M., & Yang, X. (2019). A gain-of-functional screen identifies the Hippo pathway as a central mediator of receptor tyrosine kinases during tumorigenesis. *Oncogene* 2019 39:2, 39(2), 334–355. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0988-y>
- Braicu, C., Buse, M., Busuioc, C., Drula, R., Gulei, D., Raduly, L., Rusu, A., Irimie, A., Atanasov, A. G., Slaby, O., Ionescu, C., & Berindan-Neagoe, I. (2019). cancers A Comprehensive Review on MAPK: A Promising Therapeutic Target in Cancer. *Cancers*, 11, 1618. <https://doi.org/10.3390/cancers11101618>
- Bridges, M. C., Daulagala, A. C., & Kourtidis, A. (2021). LNCcation: lncRNA localization and function. *Journal of Cell Biology*, 220(2). <https://doi.org/10.1083/JCB.202009045/211695>
- Cao, R., Ke, M., Wu, Q., Tian, Q., Liu, L., Dai, Z., Lu, S., & Liu, P. (2019). AZGP1 is androgen responsive and involved in AR-induced prostate cancer cell proliferation and metastasis. *Journal of Cellular Physiology*, 234(10), 17444–17458. <https://doi.org/10.1002/jcp.28366>
- Cardoso, C., Serafim, R. B., Kawakami, A., Gonçalves Pereira, C., Roszik, J., Valente, V., Vazquez, V. L., Fisher, D. E., & Espreafico, E. M. (2019). The lncRNA RMEL3 protects immortalized cells from serum withdrawal-induced growth arrest and

- promotes melanoma cell proliferation and tumor growth. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 32(2), 303–314. <https://doi.org/10.1111/PCMR.12751>
- Carlino, M. S., Fung, C., Shahheydari, H., Todd, J. R., Boyd, S. C., Irvine, M., Nagrial, A. M., Scolyer, R. A., Kefford, R. F., Long, G. V., & Rizos, H. (2015). Preexisting MEK1P124 mutations diminish response to BRAF inhibitors in metastatic melanoma patients. *Clinical Cancer Research*, 21(1), 98–105. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-14-0759/86301/AM/PRE-EXISTING-MEK1P124-MUTATIONS-DIMINISH-RESPONSE>
- Catalanotti, F., Cheng, D. T., Shoushtari, A. N., Johnson, D. B., Panageas, K. S., Momtaz, P., Higham, C., Won, H. H., Harding, J. J., Merghoub, T., Rosen, N., Sosman, J. A., Berger, M. F., Chapman, P. B., & Solit, D. B. (2017). PTEN Loss-of-Function Alterations Are Associated With Intrinsic Resistance to BRAF Inhibitors in Metastatic Melanoma. *https://doi.org/10.1200/PO.16.00054*, 1, 1–15. <https://doi.org/10.1200/PO.16.00054>
- Charlet, J., Tomari, A., Dallosso, A. R., Szemes, M., Kaselova, M., Curry, T. J., Almutairi, B., Etchevers, H. C., McConville, C., Malik, K. T. A., & Brown, K. W. (2017). Genome-wide DNA methylation analysis identifies MEGF10 as a novel epigenetically repressed candidate tumor suppressor gene in neuroblastoma. *Molecular Carcinogenesis*, 56(4), 1290–1301. <https://doi.org/10.1002/MC.22591>
- Chen, X., Zhang, Y., & Fu, Y. (2022). The critical role of Toll-like receptor-mediated signaling in cancer immunotherapy. *Medicine in Drug Discovery*, 14. <https://doi.org/10.1016/j.medidd.2022.100122>
- Cipriano, R., Miskimen, K. L. S., Bryson, B. L., Foy, C. R., Bartel, C. A., & Jackson, M. W. (2014). Conserved oncogenic behavior of the FAM83 family regulates MAPK signaling in human cancer. *Molecular Cancer Research*, 12(8), 1156–1165. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0289/79674/AM/CONSERVED-ONCOGENIC-BEHAVIOR-OF-THE-FAM83-FAMILY>
- Clark, M. B., Johnston, R. L., Inostroza-Ponta, M., Fox, A. H., Fortini, E., Moscato, P., Dinger, M. E., & Mattick, J. S. (2012). Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Research*, 22(5), 885–898. <https://doi.org/10.1101/GR.131037.111>
- Coricovac, D., Dehelean, C., Moaca, E. A., Pinzaru, I., Bratu, T., Navolan, D., & Boruga, O. (2018). Cutaneous Melanoma—A Long Road from Experimental Models to Clinical Outcome: A Review. *International Journal of Molecular Sciences 2018, Vol. 19, Page 1566*, 19(6), 1566. <https://doi.org/10.3390/IJMS19061566>
- Dankner, M., Rose, A. A. N., Rajkumar, S., Siegel, P. M., & Watson, I. R. (2018). Classifying BRAF alterations in cancer: new rational therapeutic strategies for actionable mutations. *Oncogene 2018 37:24*, 37(24), 3183–3199. <https://doi.org/10.1038/s41388-018-0171-x>
- Dashti, F., Mirazimi, S. M. A., Kazemioula, G., Mohammadi, M., Hosseini, M., Razaghi Bahabadi, Z., Mirazimi, M. S., Abadi, M. H. J. N., Shahini, A., Afshari, M., & Mirzaei, H. (2023). Long non-coding RNAs and melanoma: From diagnosis to therapy. *Pathology - Research and Practice*, 241, 154232. <https://doi.org/10.1016/J.PRP.2022.154232>
- 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 Melo, A. C., Wainstein, A. J. A., Buzaid, A. C., & Thuler, L. C. S. (2018). Melanoma signature in Brazil: Epidemiology, incidence, mortality, and trend lessons from a continental mixed population country in the past 15 years. *Melanoma Research*, 28(6), 629–636. <https://doi.org/10.1097/CMR.0000000000000511>
- De, M., Santos, O., Fernanda, ;, Da, C., De Lima, S., Luís, ;, Martins, F. L., Fernando, J., Oliveira, P., Liz, ;, De Almeida, M., De, M., & Cancela, C. (2023). Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil, 2023-2025. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 69(1), e-213700. <https://doi.org/10.32635/2176-9745.RBC.2023v69n1.3700>
- de Oliveira, J. C., Oliveira, L. C., Mathias, C., Pedroso, G. A., Lemos, D. S., Salviano-Silva, A., Jucoski, T. S., Lobo-Alves, S. C., Zambalde, E. P., Cipolla, G. A., & Gradia, D. F. (2019). Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity. *The Journal of Gene Medicine*, 21(1), e3065. <https://doi.org/10.1002/JGM.3065>
- Deveson, I. W., Brunck, M. E., Blackburn, J., Tseng, E., Hon, T., Clark, T. A., Clark, M. B., Crawford, J., Dinger, M. E., Nielsen, L. K., Mattick, J. S., & Mercer, T. R. (2018). Universal Alternative Splicing of Noncoding Exons. *Cell Systems*, 6(2), 245-255.e5. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2017.12.005>
- Dhall, A., Patiyal, S., Kaur, H., Bhalla, S., Arora, C., & Raghava, G. P. S. (2020). Computing Skin Cutaneous Melanoma Outcome From the HLA-Alleles and Clinical Characteristics. *Frontiers in Genetics*, 11, 514918. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2020.00221/BIBTEX>
- Diamantopoulos, M. A., Tsiakanikas, P., & Scorilas, A. (2018a). Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 241–241. <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.06.10>
- Diamantopoulos, M. A., Tsiakanikas, P., & Scorilas, A. (2018b). Non-coding RNAs: the riddle of the transcriptome and their perspectives in cancer. *Annals of Translational Medicine*, 6(12), 241–241. <https://doi.org/10.21037/ATM.2018.06.10>
- Di Fiore, R., D’Anneo, A., Tesoriere, G., & Vento, R. (2013). RB1 in cancer: Different mechanisms of RB1 inactivation and alterations of pRb pathway in tumorigenesis. *Journal of Cellular Physiology*, 228(8), 1676–1687. <https://doi.org/10.1002/JCP.24329>
- Dimitriou, F., Krattinger, R., Ramelyte, E., Barysch, M. J., Micaletto, S., Dummer, R., & Goldinger, S. M. (2018). The World of Melanoma: Epidemiologic, Genetic, and Anatomic Differences of Melanoma Across the Globe. *Current Oncology Reports*, 20(11), 1–9. <https://doi.org/10.1007/S11912-018-0732-8/FIGURES/1>
- Donia, M., Andersen, R., Kjeldsen, J. W., Fagone, P., Munir, S., Nicoletti, F., Andersen, M. H., Straten, P. T., & Svane, I. M. (2015). Aberrant expression of MHC class II in melanoma attracts inflammatory tumor-specific CD4+T-cells, which dampen CD8+T-cell antitumor reactivity. *Cancer Research*, 75(18), 3747–3759. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2956>
- Elder, D. E., Bastian, B. C., Cree, I. A., Massi, D., & Scolyer, R. A. (2020). The 2018 World Health Organization Classification of Cutaneous, Mucosal, and Uveal Melanoma: Detailed Analysis of 9 Distinct Subtypes Defined by Their Evolutionary Pathway. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 144(4), 500–522. <https://doi.org/10.5858/ARPA.2019-0561-RA>
- Excoffon, K. J. D. A., Traver, G. L., & Zabner, J. (2005). The role of the extracellular domain in the biology of the coxsackievirus and adenovirus receptor. *American journal of respiratory cell and molecular biology*, 32(6), 498–503. <https://doi.org/10.1165/RCMB.2005-0031OC>

- Farrugia, A. J., & Calvo, F. (2016). The Borg family of Cdc42 effector proteins Cdc42EP1-5. *Biochemical Society Transactions*, 44(6), 1709–1716. <https://doi.org/10.1042/BST20160219>
- Feng, R., Gong, J., Wu, L., Wang, L., Zhang, B., Liang, G., Zheng, H., & Xiao, H. (2017). MAPK and Hippo signaling pathways crosstalk via the RAF-1/MST-2 interaction in malignant melanoma. *Oncology Reports*, 38(2), 1199–1205. <https://doi.org/10.3892/OR.2017.5774/HTML>
- Fleming, I. N., Elliott, C. M., & Exton, J. H. (1996). Differential translocation of Rho family GTPases by lysophosphatidic acid, endothelin-1, and platelet-derived growth factor. *Journal of Biological Chemistry*, 271(51), 33067–33073. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.51.33067>
- Frankish, A., Diekhans, M., Jungreis, I., Lagarde, J., Loveland, J. E., Mudge, J. M., Sisu, C., Wright, J. C., Armstrong, J., Barnes, I., Berry, A., Bignell, A., Boix, C., Sala, S. C., Cunningham, F., Domenico, T. Di, Donaldson, S., Fiddes, I. T., Girón, C. G., ... Flicek, P. (2021). GENCODE 2021. *Nucleic Acids Research*, 49(D1), D916–D923. <https://doi.org/10.1093/nar/gkaa1087>
- Fu, V., Plouffe, S. W., & Guan, K. L. (2017). The Hippo pathway in organ development, homeostasis, and regeneration. *Current opinion in cell biology*, 49, 99–107. <https://doi.org/10.1016/J.CEB.2017.12.012>
- Fu, W., Cheng, Y., Zhang, Y., Mo, X., Li, T., Liu, Y., Wang, P., Pan, W., Chen, Y., Xue, Y., Ma, D., Zhang, Y., & Han, W. (2015). The Secreted Form of Transmembrane Protein 98 Promotes the Differentiation of T Helper 1 Cells. <https://home.liebertpub.com/jir>, 35(9), 720–733. <https://doi.org/10.1089/JIR.2014.0110>
- Gandini, S., Zanna, I., De Angelis, S., Palli, D., Raimondi, S., Ribero, S., Masala, G., Suppa, M., Bellerba, F., Corso, F., Nezi, L., Nagore, E., & Caini, S. (2021). TERT promoter mutations and melanoma survival: A comprehensive literature review and meta-analysis. *Critical Reviews in Oncology/Hematology*, 160, 103288. <https://doi.org/10.1016/J.CRITREVONC.2021.103288>
- Gelmi, M. C., Houtzagers, L. E., Strub, T., Krossa, I., & Jager, M. J. (2022). MITF in Normal Melanocytes, Cutaneous and Uveal Melanoma: A Delicate Balance. *International Journal of Molecular Sciences* 2022, Vol. 23, Page 6001, 23(11), 6001. <https://doi.org/10.3390/IJMS23116001>
- Germann, U. A., Furey, B. F., Markland, W., Hoover, R. R., Aronov, A. M., Roix, J. J., Hale, M., Boucher, D. M., Sorrell, D. A., Martinez-Botella, G., Fitzgibbon, M., Shapiro, P., Wick, M. J., Samadani, R., Meshaw, K., Groover, A., DeCrescenzo, G., Namchuk, M., Emery, C. M., ... Welsch, D. J. (2017). Targeting the MAPK signaling pathway in cancer: Promising preclinical activity with the novel selective ERK1/2 inhibitor BVD-523 (ulixertinib). *Molecular Cancer Therapeutics*, 16(11), 2351–2363. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-17-0456/87285/AM/TARGETING-THE-MAPK-SIGNALING-PATHWAY-IN-CANCER>
- Goedert, L. (2019). *Caracterização genômica e funcional do RMEL3, um RNA longo não codificante de expressão enriquecida em melanoma.*
- Goedert, L., Pereira, C. G., Roszik, J., Praça, J. R., Cardoso, C., Chen, G., Deng, W., Yennu-Nanda, V. G., Jr., W. A. S., Davies, M. A., Espreafico, E. M., Goedert, L., Pereira, C. G., Roszik, J., Praça, J. R., Cardoso, C., Chen, G., Deng, W., Gopal Yennu-Nanda, V., ... 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>
- Gouda, M. A., & Subbiah, V. (2023). Precision oncology for BRAF-mutant cancers with BRAF and MEK inhibitors: from melanoma to tissue-agnostic therapy. *Em ESMO Open* (Vol. 8, Número 2). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.esmoop.2023.100788>
- Green, M. R., & Sambrook, J. (2019). Rapid amplification of sequences from the 3' ends of mRNAs: 3'-RACE. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2019(5), 426–430. <https://doi.org/10.1101/pdb.prot095216>
- Guo, C. J., Ma, X. K., Xing, Y. H., Zheng, C. C., Xu, Y. F., Shan, L., Zhang, J., Wang, S., Wang, Y., Carmichael, G. G., Yang, L., & Chen, L. L. (2020). Distinct Processing of lncRNAs Contributes to Non-conserved Functions in Stem Cells. *Cell*, 181(3), 621–636.e22. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2020.03.006>
- Guo, W., Wang, H., & Li, C. (2021). Signal pathways of melanoma and targeted therapy. *Em Signal Transduction and Targeted Therapy* (Vol. 6, Número 1). Springer Nature. <https://doi.org/10.1038/s41392-021-00827-6>
- Halle, B. R., & Johnson, D. B. (2021). Defining and Targeting BRAF Mutations in Solid Tumors. *Current Treatment Options in Oncology*, 22(4), 1–15. <https://doi.org/10.1007/S11864-021-00827-2/FIGURES/1>
- Haq, R., Shoag, J., Andreu-Perez, P., Yokoyama, S., Edelman, H., Rowe, G. C., Frederick, D. T., Hurley, A. D., Nellore, A., Kung, A. L., Wargo, J. A., Song, J. S., Fisher, D. E., Arany, Z., & Widlund, H. R. (2013). Oncogenic BRAF Regulates Oxidative Metabolism via PGC1 α and MITF. *Cancer Cell*, 23(3), 302–315. <https://doi.org/10.1016/J.CCR.2013.02.003>
- Hartman, M. L., & Czyz, M. (2013). Anti-apoptotic proteins on guard of melanoma cell survival. *Cancer Letters*, 331(1), 24–34. <https://doi.org/10.1016/J.CANLET.2013.01.010>
- Hassan, M. I., Waheed, A., Yadav, S., Singh, T. P., & Ahmad, F. (2008). Zinc α 2-glycoprotein: A multidisciplinary protein. *Em Molecular Cancer Research* (Vol. 6, Número 6, p. 892–906). <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-07-2195>
- Hauschild, A., Grob, J. J., Demidov, L. V., Jouary, T., Gutzmer, R., Millward, M., Rutkowski, P., Blank, C. U., Miller, W. H., Kaempgen, E., Martín-Algarra, S., Karaszewska, B., Mauch, C., Chiarion-Sileni, V., Martin, A. M., Swann, S., Haney, P., Mirakhur, B., Guckert, M. E., ... Chapman, P. B. (2012). Dabrafenib in BRAF-mutated metastatic melanoma: A multicentre, open-label, phase 3 randomised controlled trial. *The Lancet*, 380(9839), 358–365. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60868-X](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60868-X)
- Helfrich, I., & Singer, B. B. (2019). Size matters: The functional role of the CEACAM1 isoform signature and its impact for NK cell-mediated killing in melanoma. *Em Cancers* (Vol. 11, Número 3). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/cancers11030356>
- Hemon, P., Jean-Louis, F., Ramgolam, K., Brignone, C., Viguier, M., Bachelez, H., Triebel, F., Charron, D., Aoudjit, F., Al-Daccak, R., & Michel, L. (2011). MHC Class II Engagement by Its Ligand LAG-3 (CD223) Contributes to Melanoma Resistance to Apoptosis. *The Journal of Immunology*, 186(9), 5173–5183. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1002050>
- Hsiao, H. W., Hsu, T. S., Liu, W. H., Hsieh, W. C., Chou, T. F., Wu, Y. J., Jiang, S. T., & Lai, M. Z. (2015). Deltex1 antagonizes HIF-1 α and sustains the stability of regulatory T cells in vivo. *Nature Communications*, 6. <https://doi.org/10.1038/ncomms7353>

- Hunter Shain, A., & Bastian, B. C. (2016). From melanocytes to melanomas. *Nature Publishing Group*. <https://doi.org/10.1038/nrc.2016.37>
- Hussain, M. R. M., Baig, M., Mohamoud, H. S. A., Ulhaq, Z., Hoessli, D. C., Khogeer, G. S., Al-Sayed, R. R., & Al-Aama, J. Y. (2015). BRAF gene: From human cancers to developmental syndromes. Em *Saudi Journal of Biological Sciences* (Vol. 22, Número 4, p. 359–373). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.sjbs.2014.10.002>
- Imamura, F., Horai, T., Mukai, M., Shinkai, K., Sawada, M., & Akedo, H. (1993). Induction of in vitro tumor cell invasion of cellular monolayers by lysophosphatidic acid or phospholipase D. *Biochemical and biophysical research communications*, 193(2), 497–503. <https://doi.org/10.1006/BBRC.1993.1651>
- Ito, H., Morishita, R., & Nagata, K. I. (2018). Functions of rhotekin, an effector of rho gtpase, and its binding partners in mammals. Em *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 19, Número 7). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms19072121>
- Jankowski, M. (2011). Autotaxin: Its role in biology of melanoma cells and as a pharmacological target. *Enzyme Research*, 2011(1). <https://doi.org/10.4061/2011/194857>
- Jiramongkol, Y., & Lam, E. W. F. (2020). FOXO transcription factor family in cancer and metastasis. *Cancer metastasis reviews*, 39(3), 681–709. <https://doi.org/10.1007/S10555-020-09883-W>
- Johannessen, C. M., Boehm, J. S., Kim, S. Y., Thomas, S. R., Wardwell, L., Johnson, L. A., Emery, C. M., Stransky, N., Cogdill, A. P., Barretina, J., Caponigro, G., Hieronymus, H., Murray, R. R., Salehi-Ashtiani, K., Hill, D. E., Vidal, M., Zhao, J. J., Yang, X., Alkan, O., ... Garraway, L. A. (2010). COT drives resistance to RAF inhibition through MAP kinase pathway reactivation. *Nature* 2010 468:7326, 468(7326), 968–972. <https://doi.org/10.1038/nature09627>
- Johnson, D. B., Estrada, M. V., Salgado, R., Sanchez, V., Doxie, D. B., Opalenik, S. R., Vilgelm, A. E., Feld, E., Johnson, A. S., Greenplate, A. R., Sanders, M. E., Lovly, C. M., Frederick, D. T., Kelley, M. C., Richmond, A., Irish, J. M., Shyr, Y., Sullivan, R. J., Puzanov, I., ... Balko, J. M. (2016). Melanoma-specific MHC-II expression represents a tumour-autonomous phenotype and predicts response to anti-PD-1/PD-L1 therapy. *Nature Communications*, 7. <https://doi.org/10.1038/NCOMMS10582>
- Johnson, D. B., Menzies, A. M., Zimmer, L., Eroglu, Z., Ye, F., Zhao, S., Rizos, H., Sucker, A., Scolyer, R. A., Gutzmer, R., Gogas, H., Kefford, R. F., Thompson, J. F., Becker, J. C., Berking, C., Egberts, F., Loquai, C., Goldinger, S. M., Pupo, G. M., ... Schadendorf, D. (2015). Acquired BRAF inhibitor resistance: A multicenter meta-analysis of the spectrum and frequencies, clinical behaviour, and phenotypic associations of resistance mechanisms. *European Journal of Cancer*, 51(18), 2792–2799. <https://doi.org/10.1016/J.EJCA.2015.08.022>
- Kakinuma, N., Zhu, Y., Wang, Y., Roy, B. C., & Kiyama, R. (2009). Kank proteins: Structure, functions and diseases. Em *Cellular and Molecular Life Sciences* (Vol. 66, Número 16, p. 2651–2659). <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0038-y>
- Karimian, A., Ahmadi, Y., & Yousefi, B. (2016). Multiple functions of p21 in cell cycle, apoptosis and transcriptional regulation after DNA damage. *DNA Repair*, 42, 63–71. <https://doi.org/10.1016/J.DNAREP.2016.04.008>
- Karreth, F. A., DeNicola, G. M., Winter, S. P., & Tuveson, D. A. (2009). C-Raf Inhibits MAPK Activation and Transformation by B-RafV600E. *Molecular Cell*, 36(3), 477–486. <https://doi.org/10.1016/J.MOLCEL.2009.10.017>

- Kent, W. J. (2002). BLAT—The BLAST-Like Alignment Tool. *Genome Research*, 12(4), 656–664. <https://doi.org/10.1101/GR.229202>
- Kezic, A., Popovic, L., & Lalic, K. (2018). *mTOR Inhibitor Therapy and Metabolic Consequences: Where Do We Stand?* <https://doi.org/10.1155/2018/2640342>
- Kornfeld, J.-W., Leucci, E., Leuven, vib-K., Ulf Andersson Ørom, B., Kretz, M., & Ziegler, C. (2017). *The More the Merrier-Complexity in Long non-Coding RnA Loci*. 8, 25. <https://doi.org/10.3389/fendo.2017.00090>
- Krauthammer, M., Kong, Y., Ha, B. H., Evans, P., Bacchiocchi, A., McCusker, J. P., Cheng, E., Davis, M. J., Goh, G., Choi, M., Ariyan, S., Narayan, D., Dutton-Regester, K., Capatana, A., Holman, E. C., Bosenberg, M., Sznol, M., Kluger, H. M., Brash, D. E., ... Halaban, R. (2012). Exome sequencing identifies recurrent somatic RAC1 mutations in melanoma. *Nature Genetics* 2012 44:9, 44(9), 1006–1014. <https://doi.org/10.1038/ng.2359>
- Kubo, Y., Baba, K., Toriyama, M., Minegishi, T., Sugiura, T., Kozawa, S., Ikeda, K., & Inagaki, N. (2015). Shootin1-cortactin interaction mediates signal-force transduction for axon outgrowth. *Journal of Cell Biology*, 210(4), 663–676. <https://doi.org/10.1083/jcb.201505011>
- Ladányi, A., Papp, E., Mohos, A., Balatoni, T., Liskay, G., Oláh, J., Varga, A., Lengyel, Z., Emri, G., & Ferrone, S. (2020). Role of the anatomic site in the association of HLA class I antigen expression level in metastases with clinical response to ipilimumab therapy in patients with melanoma. *Journal for Immunotherapy of Cancer*, 8(1). <https://doi.org/10.1136/JITC-2019-000209>
- Leiter, U., Keim, U., & Garbe, C. (2020). Epidemiology of skin cancer: Update 2019. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 1268, 123–139. https://doi.org/10.1007/978-3-030-46227-7_6/COVER
- Liberzon, A., Birger, C., Thorvaldsdóttir, H., Ghandi, M., Mesirov, J. P., & Tamayo, P. (2015). The Molecular Signatures Database (MSigDB) hallmark gene set collection. *Cell systems*, 1(6), 417. <https://doi.org/10.1016/J.CELS.2015.12.004>
- Lim, S. Y., Menzies, A. M., & Rizos, H. (2017a). Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Em Cancer* (Vol. 123, p. 2118–2129). John Wiley and Sons Inc. <https://doi.org/10.1002/cncr.30435>
- Lim, S. Y., Menzies, A. M., & Rizos, H. (2017b). Mechanisms and strategies to overcome resistance to molecularly targeted therapy for melanoma. *Cancer*, 123(S11), 2118–2129. <https://doi.org/10.1002/CNCR.30435>
- Lin, C., & Yang, L. (2018). Long Noncoding RNA in Cancer: Wiring Signaling Circuitry. *Trends in Cell Biology*, 28(4), 287–301. <https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.11.008>
- Lin, K. H., Chiang, J. C., Ho, Y. H., Yao, C. L., & Lee, H. (2020). Lysophosphatidic Acid and Hematopoiesis: From Microenvironmental Effects to Intracellular Signaling. *International Journal of Molecular Sciences* 2020, Vol. 21, Page 2015, 21(6), 2015. <https://doi.org/10.3390/IJMS21062015>
- Lin, Y. H., Lin, Y. C., & Chen, C. C. (2021). Lysophosphatidic Acid Receptor Antagonists and Cancer: The Current Trends, Clinical Implications, and Trials. *Cells* 2021, Vol. 10, Page 1629, 10(7), 1629. <https://doi.org/10.3390/CELLS10071629>
- Li, T., Su, L., Lei, Y., Liu, X., Zhang, Y., & Liu, X. (2015). DDIT3 and KAT2A proteins regulate TNFRSF10A and TNFRSF10B expression in endoplasmic reticulum stress-mediated apoptosis in human lung cancer cells. *Journal of Biological Chemistry*, 290(17), 11108–11118. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645333>

- Liu, Y., Xu, X., Zhang, Y., Mo, Y., Sun, X., Shu, L., & Ke, Y. (2022). Paradoxical role of $\beta 8$ integrin on angiogenesis and vasculogenic mimicry in glioblastoma. *Cell Death and Disease*, 13(6). <https://doi.org/10.1038/s41419-022-04959-7>
- Long, L., Zhang, X., Chen, F., Pan, Q., Phiphatwatchara, P., Zeng, Y., & Chen, H. (2018). The promising immune checkpoint LAG-3: from tumor microenvironment to cancer immunotherapy. Em *www.Genes&Cancer.com Genes & Cancer* (Vol. 9, Número 6).
- Luo, W., & Brouwer, C. (2013). Pathview: an R/Bioconductor package for pathway-based data integration and visualization. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 29(14), 1830–1831. <https://doi.org/10.1093/BIOINFORMATICS/BTT285>
- Lv, Z., Ding, Y., Cao, W., Wang, S., & Gao, K. (2022). Role of RHO family interacting cell polarization regulators (RIPORs) in health and disease: Recent advances and prospects. Em *International Journal of Biological Sciences* (Vol. 18, Número 2, p. 800–808). Ivyspring International Publisher. <https://doi.org/10.7150/ijbs.65457>
- Malek, N., Michrowska, A., Mazurkiewicz, E., Mrówczyńska, E., Mackiewicz, P., & Mazur, A. J. (2021). The origin of the expressed retrotransposed gene ACTBL2 and its influence on human melanoma cells' motility and focal adhesion formation. *Scientific Reports 2021 11:1*, 11(1), 1–26. <https://doi.org/10.1038/s41598-021-82074-x>
- Martin, F. J., Amode, M. R., Aneja, A., Austine-Orimoloye, O., Azov, A. G., Barnes, I., Becker, A., Bennett, R., Berry, A., Bhai, J., Bhurji, S. K., Bignell, A., Boddu, S., Branco Lins, P. R., Brooks, L., Ramaraju, S. B., Charkhchi, M., Cockburn, A., Da Rin Fiorretto, L., ... Flicek, P. (2023). Ensembl 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D933–D941. <https://doi.org/10.1093/NAR/GKAC958>
- 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>
- Massi, D., Mihic-Probst, D., Schadendorf, D., Dummer, R., & Mandalà, M. (2020). Dedifferentiated melanomas: Morpho-phenotypic profile, genetic reprogramming and clinical implications. Em *Cancer Treatment Reviews* (Vol. 88). W.B. Saunders Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.ctrv.2020.102060>
- Matallanas, D., Birtwistle, M., Romano, D., Zebisch, A., Rauch, J., von Kriegsheim, A., & Kolch, W. (2011). Raf family kinases: old dogs have learned new tricks. *Genes Cancer*, 2(3), 232–260. <https://doi.org/10.1177/1947601911407323>
- Matas-Rico, E., Frijlink, E., van der Haar Àvila, I., Menegakis, A., van Zon, M., Morris, A. J., Koster, J., Salgado-Polo, F., de Kivit, S., Lança, T., Mazzocca, A., Johnson, Z., Haanen, J., Schumacher, T. N., Perrakis, A., Verbrugge, I., van den Berg, J. H., Borst, J., & Moolenaar, W. H. (2021). Autotaxin impedes anti-tumor immunity by suppressing chemotaxis and tumor infiltration of CD8+ T cells. *Cell Reports*, 37(7), 110013. <https://doi.org/10.1016/J.CELREP.2021.110013>
- Mattick, J. S., Amaral, P. P., Carninci, P., Carpenter, S., Chang, H. Y., Chen, L. L., Chen, R., Dean, C., Dinger, M. E., Fitzgerald, K. A., Gingeras, T. R., Guttman, M., Hirose, T., Huarte, M., Johnson, R., Kanduri, C., Kapranov, P., Lawrence, J. B., Lee, J. T., ... Wu, M. (2023). Long non-coding RNAs: definitions, functions, challenges and recommendations. *Nature Reviews Molecular Cell Biology 2023 24:6*, 24(6), 430–447. <https://doi.org/10.1038/s41580-022-00566-8>
- Mazur, A. J., Radaszkiewicz, T., Makowiecka, A., Malicka-Błaszczkiewicz, M., Mannherz, H. G., & Nowak, D. (2016). Gelsolin interacts with LamR, hnRNP U, nestin, Arp3 and β -tubulin in human melanoma cells as revealed by immunoprecipitation and mass

- spectrometry. *European Journal of Cell Biology*, 95(1), 26–41. <https://doi.org/10.1016/J.EJCB.2015.11.001>
- Melixetian, M., Pelicci, P. G., & Lanfrancone, L. (2022). Regulation of LncRNAs in Melanoma and Their Functional Roles in the Metastatic Process. *Cells* 2022, Vol. 11, Page 577, 11(3), 577. <https://doi.org/10.3390/CELLS11030577>
- Mercer, T. R., Wilhelm, D., Dinger, M. E., Soldà, G., Korbie, D. J., Glazov, E. A., Truong, V., Schwenke, M., Simons, C., Matthaei, K. I., Saint, R., Koopman, P., & Mattick, J. S. (2011). Expression of distinct RNAs from 3' untranslated regions. *Nucleic Acids Research*, 39(6), 2393–2403. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1158>
- Minami, K., Ueda, N., Maeda, H., Ishimoto, K., Otagaki, S., & Tsujiuchi, T. (2019). Modulation of chemoresistance by lysophosphatidic acid (LPA) signaling through LPA5 in melanoma cells treated with anticancer drugs. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 517(2), 359–363. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2019.07.092>
- Morante, M., Pandiella, A., Crespo, P., & Herrero, A. (2022). Immune Checkpoint Inhibitors and RAS–ERK Pathway-Targeted Drugs as Combined Therapy for the Treatment of Melanoma. *Em Biomolecules* (Vol. 12, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/biom12111562>
- Moreno, M., Schmitt, R. L., Lang, M. G., & Gheno, V. (2012). Epidemiological Profile of Patients with Cutaneous Melanoma in a Region of Southern Brazil. *Journal of Skin Cancer*, 2012, 1–8. <https://doi.org/10.1155/2012/917346>
- Naik, P. P. (2021). Cutaneous Malignant Melanoma: A Review of Early Diagnosis and Management. *World Journal of Oncology*, 12(1), 7–19. <https://doi.org/10.14740/wjon1349>
- Nicolson, N. G., & Han, D. (2019). Desmoplastic melanoma. *Journal of Surgical Oncology*, 119(2), 208–215. <https://doi.org/10.1002/JSO.25317>
- Oba, J., & Woodman, S. E. (2021). The genetic and epigenetic basis of distinct melanoma types. *The Journal of Dermatology*, 48(7), 925–939. <https://doi.org/10.1111/1346-8138.15957>
- O'Neill, E., Rushworth, L., Baccarini, M., & Kolch, W. (2004). Role of the kinase MST2 in suppression of apoptosis by the proto-oncogene product Raf-1. *Science*, 306(5705), 2267–2270. <https://doi.org/10.1126/science.1103233>
- Parkman, G. L., Turapov, T., Kircher, D. A., Burnett, W. J., Stehn, C. M., O'Toole, K., Flaherty, R., Elmer, R. C., Culver, K. M., Foth, M., Andtbacka, R. H. I., Lum, D. H., Judson-Torres, R., VanBrocklin, M. W., Holmen, S. L., & McMahon, M. (2022). Genetic silencing of AKT induces melanoma cell death. *bioRxiv*, 2022.08.15.504039. <https://doi.org/10.1101/2022.08.15.504039>
- Patop, I. L., Wüst, S., & Kadener, S. (2019). Past, present, and future of circ RNA s . *The EMBO Journal*, 38(16). <https://doi.org/10.15252/embj.2018100836>
- Peng, S. L., Gerth, A. J., Ranger, A. M., & Glimcher, L. H. (2001). NFATc1 and NFATc2 together control both T and B cell activation and differentiation. *Immunity*, 14(1), 13–20. [https://doi.org/10.1016/S1074-7613\(01\)00085-1](https://doi.org/10.1016/S1074-7613(01)00085-1)
- Proietti, I., Skroza, N., Bernardini, N., Tolino, E., Balduzzi, V., Marchesiello, A., Michelini, S., Volpe, S., Mambrin, A., Mangino, G., Romeo, G., Maddalena, P., Rees, C., & Potenza, C. (2020). Mechanisms of Acquired BRAF Inhibitor Resistance in Melanoma: A Systematic Review. *Cancers* 2020, Vol. 12, Page 2801, 12(10), 2801. <https://doi.org/10.3390/CANCERS12102801>

- Rabbie, R., Ferguson, P., Molina-Aguilar, C., Adams, D. J., & Robles-Espinoza, C. D. (2019). Melanoma subtypes: genomic profiles, prognostic molecular markers and therapeutic possibilities. *Em Journal of Pathology* (Vol. 247, Número 5, p. 539–551). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1002/path.5213>
- Ramanathan, M., Majzoub, K., Rao, D. S., Neela, P. H., Zarnegar, B. J., Mondal, S., Roth, J. G., Gai, H., Kovalski, J. R., Siprashvili, Z., Palmer, T. D., Carette, J. E., & Khavari, P. A. (2018). RNA–protein interaction detection in living cells. *Nature Methods* 2018 15:3, 15(3), 207–212. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4601>
- Ramsdale, R., Jorissen, R. N., Li, F. Z., Al-Obaidi, S., Ward, T., Sheppard, K. E., Bukczynska, P. E., Young, R. J., Boyle, S. E., Shackleton, M., Bollag, G., Long, G. V., Tulchinsky, E., Rizos, H., Pearson, R. B., McArthur, G. A., Dhillon, A. S., & Ferrao, P. T. (2015). The transcription cofactor c-JUN mediates phenotype switching and BRAF inhibitor resistance in melanoma. *Science Signaling*, 8(390), ra82. https://doi.org/10.1126/SCISIGNAL.AAB1111/SUPPL_FILE/8_RA82_SM.PDF
- Rauch, J., & Kolch, W. (2019). Spatial regulation of ARAF controls the MST2-Hippo pathway. *Small GTPases*, 10(4), 243–248. <https://doi.org/10.1080/21541248.2017.1288686>
- Rauch, J., O’Neill, E., Mack, B., Matthias, C., Munz, M., Kolch, W., & Gires, O. (2010). Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H blocks MST2-mediated apoptosis in cancer cells by regulating a-raf transcription. *Cancer Res*, 70(4), 1679–1688. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.can-09-2740>
- Rauch, J., Vandamme, D., Mack, B., Mccann, B., Volinsky, N., Blanco, A., Gires, O., & Kolch, W. (2016). Differential localization of A-Raf regulates MST2-mediated apoptosis during epithelial differentiation. *Cell Death & Differentiation* 2016 23:8, 23(8), 1283–1295. <https://doi.org/10.1038/cdd.2016.2>
- Rebocho, A. P., & Marais, R. (2012). ARAF acts as a scaffold to stabilize BRAF:CRAF heterodimers. *Oncogene* 2013 32:26, 32(26), 3207–3212. <https://doi.org/10.1038/onc.2012.330>
- Rinn, J. L., & Chang, H. Y. (2020). Long Noncoding RNAs: Molecular Modalities to Organismal Functions. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062917-012708>, 89, 283–308. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-BIOCHEM-062917-012708>
- Ritt, D. A., Monson, D. M., Specht, S. I., & Morrison, D. K. (2010). Impact of Feedback Phosphorylation and Raf Heterodimerization on Normal and Mutant B-Raf Signaling. *Molecular and Cellular Biology*, 30(3), 806–819. <https://doi.org/10.1128/mcb.00569-09>
- Ross, T., Jakubzig, B., Grundmann, M., Massing, U., Kostenis, E., Schlesinger, M., & Bendas, G. (2016). The molecular mechanism by which saturated lysophosphatidylcholine attenuates the metastatic capacity of melanoma cells. *FEBS Open Bio*, 6(12), 1297–1309. <https://doi.org/10.1002/2211-5463.12152>
- Sadok, A., McCarthy, A., Caldwell, J., Collins, I., Garrett, M. D., Yeo, M., Hooper, S., Sahai, E., Kiemper, S., Mardakheh, F. K., & Marshall, C. J. (2015). Rho kinase inhibitors block melanoma cell migration and inhibit metastasis. *Cancer Research*, 75(11), 2272–2284. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-14-2156>
- Samadi, N., Bekele, R., Capatos, D., Venkatraman, G., Sariahmetoglu, M., & Brindley, D. N. (2011). Regulation of lysophosphatidate signaling by autotaxin and lipid phosphate phosphatases with respect to tumor progression, angiogenesis, metastasis and chemoresistance. *Biochimie*, 93(1), 61–70. <https://doi.org/10.1016/J.BIOCHI.2010.08.002>

- Sarropoulos, I., Marin, R., Cardoso-Moreira, M., & Kaessmann, H. (2019). Developmental dynamics of lncRNAs across mammalian organs and species. *Nature* 2019 571:7766, 571(7766), 510–514. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1341-x>
- Schadendorf, D., van Akkooi, A. C. J., Berking, C., Griewank, K. G., Gutzmer, R., Hauschild, A., Stang, A., Roesch, A., & Ugurel, S. (2018). Melanoma. *The Lancet*, 392(10151), 971–984. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31559-9](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31559-9)
- 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. Em *Nature Methods* (Vol. 9, Número 7, p. 676–682). <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Scolyer, R. A., Long, G. V., & Thompson, J. F. (2011). Evolving concepts in melanoma classification and their relevance to multidisciplinary melanoma patient care. Em *Molecular Oncology* (Vol. 5, Número 2, p. 124–136). John Wiley and Sons Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.molonc.2011.03.002>
- Scotto-Lavino, E., Du, G., & Frohman, M. A. (2007). 3' End cDNA amplification using classic RACE. *Nature Protocols*, 1(6), 2742–2745. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.481>
- Shaffer, S. M., Dunagin, M. C., Torborg, S. R., Torre, E. A., Emert, B., Krepler, C., Beqiri, M., Sproesser, K., Brafford, P. A., Xiao, M., Eggen, E., Anastopoulos, I. N., Vargas-Garcia, C. A., Singh, A., Nathanson, K. L., Herlyn, M., & Raj, A. (2017). Rare cell variability and drug-induced reprogramming as a mode of cancer drug resistance. *Nature* 2017 546:7658, 546(7658), 431–435. <https://doi.org/10.1038/nature22794>
- Smalley, K. S. M., Lioni, M., Palma, M. D., Xiao, M., Desai, B., Egyhazi, S., Hansson, J., Wu, H., King, A. J., Van Belle, P., Elder, D. E., Flaherty, K. T., Herlyn, M., & Nathanson, K. L. (2008). Increased cyclin D1 expression can mediate BRAF inhibitor resistance in BRAF V600E–mutated melanomas. *Molecular Cancer Therapeutics*, 7(9), 2876–2883. <https://doi.org/10.1158/1535-7163.MCT-08-0431>
- Soltysova, A., Dvorska, D., Horvathova Kajabova, V., Pecimonova, M., Ficek, A., Demkova, L., Babal, P., Juras Lambda Life, I., Katarina Janikova, as, Bratislava, in, Lyskova, D., Dankova, Z., Smolkova, B., & Furdova, A. (2023). *DNA methylation aberrancy is a reliable prognostic tool in uveal melanoma*. <https://doi.org/10.21203/RS.3.RS-2502537/V2>
- Soriano, O., Alcón-Pérez, M., Vicente-Manzanares, M., & Castellano, E. (2021). The Crossroads between RAS and RHO Signaling Pathways in Cellular Transformation, Motility and Contraction. *Genes* 2021, Vol. 12, Page 819, 12(6), 819. <https://doi.org/10.3390/GENES12060819>
- Sosman, J. A., Kim, K. B., Schuchter, L., Gonzalez, R., Pavlick, A. C., Weber, J. S., McArthur, G. A., Hutson, T. E., Moschos, S. J., Flaherty, K. T., Hersey, P., Kefford, R., Lawrence, D., Puzanov, I., Lewis, K. D., Amaravadi, R. K., Chmielowski, B., Lawrence, H. J., Shyr, Y., ... Ribas, A. (2012). Survival in BRAF V600–Mutant Advanced Melanoma Treated with Vemurafenib. *New England Journal of Medicine*, 366(8), 707–714. https://doi.org/10.1056/NEJMOA1112302/SUPPL_FILE/NEJMOA1112302_DISCLOSURES.PDF
- Sousa, J. F., Torrieri, R., Silva, R. R., Pereira, C. G., Valente, V., Torrieri, E., Peronni, K. C., Martins, W., Muto, N., Francisco, G., Brohem, C. A., Carlotti, C. G., Maria-Engler, S. S., Chammas, R., & Espreafico, E. M. (2010). Novel Primate-Specific Genes,

- RMEL 1, 2 and 3, with Highly Restricted Expression in Melanoma, Assessed by New Data Mining Tool. *PLOS ONE*, 5(10), e13510. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PONE.0013510>
- Spicuglia, S., Bonnet, M., & Ferrier, P. (2007). [Alpha/beta versus gamma/delta T cell development: a choice linked to the transcription factor Sox13]. *Medecine Sciences : M/S*, 23(5), 457–458. <https://doi.org/10.1051/MEDSCI/2007235457>
- Statello, L., Guo, C. J., Chen, L. L., & Huarte, M. (2020). Gene regulation by long non-coding RNAs and its biological functions. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2020 22:2, 22(2), 96–118. <https://doi.org/10.1038/s41580-020-00315-9>
- Stelzer, G., Rosen, N., Plaschkes, I., Zimmerman, S., Twik, M., Fishilevich, S., Iny Stein, T., Nudel, R., Lieder, I., Mazor, Y., Kaplan, S., Dahary, D., Warshawsky, D., Guan-Golan, Y., Kohn, A., Rappaport, N., Safran, M., & Lancet, D. (2016). The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current Protocols in Bioinformatics*, 54(1), 1.30.1-1.30.33. <https://doi.org/10.1002/CPBI.5>
- Stracke, M. L., Krutzsch, H. C., Unsworth, E. J., Arestad, A., Cioce, V., Schiffmann, E., & Liotta, L. A. (1992). Identification, purification, and partial sequence analysis of autotaxin, a novel motility-stimulating protein. *Journal of Biological Chemistry*, 267(4), 2524–2529. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)45911-X](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)45911-X)
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V. K., Mukherjee, S., Ebert, B. L., Gillette, M. A., Paulovich, A., Pomeroy, S. L., Golub, T. R., Lander, E. S., & Mesirov, J. P. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102(43), 15545–15550. https://doi.org/10.1073/PNAS.0506580102/SUPPL_FILE/06580FIG7.JPG
- Sun, B. K., Sibrashvili, Z., & Khavari, P. A. (2014). Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds. *Em Science* (Vol. 346, Número 6212, p. 941–945). American Association for the Advancement of Science. <https://doi.org/10.1126/science.1253836>
- Sung, H., Ferlay, J., Siegel, R. L., Laversanne, M., Soerjomataram, I., Jemal, A., & Bray, F. (2021). Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 71(3), 209–249. <https://doi.org/10.3322/caac.21660>
- Sun, L., Guan, Z., Wei, S., Tan, R., Li, P., & Yan, L. (2019). Identification of long non-coding and messenger RNAs differentially expressed between primary and metastatic melanoma. *Frontiers in Genetics*, 10(APR), 292. <https://doi.org/10.3389/FGENE.2019.00292/BIBTEX>
- Sun, L., Zhang, Y., Yang, T., Chen, J., Zhang, X., & Liang, X. (2022). IGFBP2 Drives Regulatory T Cell Differentiation through STAT3/IDO Signaling Pathway in Pancreatic Cancer. *Journal of Personalized Medicine*, 12(12). <https://doi.org/10.3390/jpm12122005>
- Taiana, E., Ronchetti, D., Todoerti, K., Nobili, L., Tassone, P., Amodio, N., & Neri, A. (2020). LncRNA NEAT1 in Paraspeckles: A Structural Scaffold for Cellular DNA Damage Response Systems? *Non-Coding RNA* 2020, Vol. 6, Page 26, 6(3), 26. <https://doi.org/10.3390/NCRNA6030026>
- Tamada, K., Shimozaki, K., Chapoval, A. I., Zhai, Y., Su, J., Chen, S.-F., Hsieh, S.-L., Nagata, S., Ni, J., & Chen, L. (2000). LIGHT, a TNF-like molecule, costimulates T cell proliferation and is required for dendritic cell-mediated allogeneic T cell response. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 164(8), 4105–4110. <https://doi.org/10.4049/JIMMUNOL.164.8.4105>

- Tangella, L. P., Clark, M. E., & Gray, E. S. (2021). Resistance mechanisms to targeted therapy in BRAF-mutant melanoma - A mini review. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, 1865(1), 129736. <https://doi.org/10.1016/J.BBAGEN.2020.129736>
- Template switching oligos (TS oligos, TSOs) for cDNA library construction / IDT. ([s.d.]). Recuperado 30 de maio de 2023, de <https://www.idtdna.com/pages/education/decoded/article/use-of-template-switching-oligos-%28ts-oligos-tsos%29-for-efficient-cdna-library-construction>
- Thevakumaran, N., Lavoie, H., Critton, D. A., Tebben, A., Marinier, A., Sicheri, F., & Therrien, M. (2014). Crystal structure of a BRAF kinase domain monomer explains basis for allosteric regulation. *Nature Structural & Molecular Biology* 2014 22:1, 22(1), 37–43. <https://doi.org/10.1038/nsmb.2924>
- Tian, Y., & Guo, W. (2020). A Review of the Molecular Pathways Involved in Resistance to BRAF Inhibitors in Patients with Advanced-Stage Melanoma. *Medical Science Monitor : International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 26, e920957-1. <https://doi.org/10.12659/MSM.920957>
- Tsai, J., Lee, J. T., Wang, W., Zhang, J., Cho, H., Mamo, S., Bremer, R., Gillette, S., Kong, J., Haass, N. K., Sproesser, K., Li, L., Smalley, K. S. M., Fong, D., Zhu, Y. L., Marimuthu, A., Nguyen, H., Lam, B., Liu, J., ... Bollag, G. (2008). Discovery of a selective inhibitor of oncogenic B-Raf kinase with potent antimelanoma activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(8), 3041–3046. https://doi.org/10.1073/PNAS.0711741105/SUPPL_FILE/11741FIG6.JPG
- Tullai, J. W., Schaffer, M. E., Mullenbrock, S., Sholder, G., Kasif, S., & Cooper, G. M. (2007). Immediate-early and delayed primary response genes are distinct in function and genomic architecture. *Journal of Biological Chemistry*, 282(33), 23981–23995. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702044200>
- Vancoppenolle, J. M., Koole, S. N., O'Mahony, J. F., Franzen, N., Burgers, J. A., Retèl, V. P., & van Harten, W. H. (2023). Targeted combination therapies in oncology: Challenging regulatory frameworks designed for monotherapies in Europe. *Drug Discovery Today*, 103620. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2023.103620>
- Van Damme, J., De Ley, M., Opdenakker, G., Billiau, A., De Somer, P., & Beeumen, J. Van. (1985). Homogeneous interferon-inducing 22K factor is related to endogenous pyrogen and interleukin-1. *Nature*, 314(6008), 266–268. <https://doi.org/10.1038/314266A0>
- van Poppelen, N. M., de Bruyn, D. P., Bicer, T., Verdijk, R., Naus, N., Mensink, H., Paridaens, D., de Klein, A., Brosens, E., & Kiliç, E. (2020). Genetics of Ocular Melanoma: Insights into Genetics, Inheritance and Testing. *International Journal of Molecular Sciences* 2021, Vol. 22, Page 336, 22(1), 336. <https://doi.org/10.3390/IJMS22010336>
- Vergani, E., Di Guardo, L., Dugo, M., Rigoletto, S., Tragni, G., Ruggeri, R., Perrone, F., Tamborini, E., Gloghini, A., Arienti, F., Vergani, B., Deho, P., De Cecco, L., Vallacchi, V., Frati, P., Shahaj, E., Villa, A., Santinami, M., De Braud, F., ... Rodolfo, M. (2016). Overcoming melanoma resistance to vemurafenib by targeting CCL2-induced miR-34a, miR-100 and miR-125b. *Oncotarget*, 7(4), 4428. <https://doi.org/10.18632/ONCOTARGET.6599>
- Wagstaff, W., Mwamba, R. N., Grullon, K., Armstrong, M., Zhao, P., Hendren-Santiago, B., Qin, K. H., Li, A. J., Hu, D. A., Youssef, A., Reid, R. R., Luu, H. H., Shen, L., He,

- T. C., & Haydon, R. C. (2022). Melanoma: Molecular genetics, metastasis, targeted therapies, immunotherapies, and therapeutic resistance. *Em Genes and Diseases* (Vol. 9, Número 6, p. 1608–1623). Chongqing University. <https://doi.org/10.1016/j.gendis.2022.04.004>
- Walter, P., & Ron, D. (2011). The unfolded protein response: From stress pathway to homeostatic regulation. *Science*, 334(6059), 1081–1086. https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1209038/ASSET/238BD530-CE66-4C19-BA32-FC13641E3646/ASSETS/GRAPHIC/334_1081_F3.JPEG
- Wang, D., Han, S., Peng, R., Wang, X., Yang, X. X., Yang, R. J., Jiao, C. Y., Ding, D., Ji, G. W., & Li, X. C. (2015). FAM83D activates the MEK/ERK signaling pathway and promotes cell proliferation in hepatocellular carcinoma. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 458(2), 313–320. <https://doi.org/10.1016/J.BBRC.2015.01.108>
- Wang, W., Min, L., Qiu, X., Wu, X., Liu, C., Ma, J., Zhang, D., & Zhu, L. (2021). Biological Function of Long Non-coding RNA (LncRNA) Xist. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 9, 1447. <https://doi.org/10.3389/FCELL.2021.645647/BIBTEX>
- Wan, Y. Y. (2014). GATA3: A master of many trades in immune regulation. *Em Trends in Immunology* (Vol. 35, Número 6, p. 233–242). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.it.2014.04.002>
- Whittaker, S. R., Theurillat, J. P., Van Allen, E., Wagle, N., Hsiao, J., Cowley, G. S., Schadendorf, D., Root, D. E., & Garraway, L. A. (2013). A genome-scale RNA interference screen implicates NF1 loss in resistance to RAF inhibition. *Cancer Discovery*, 3(3), 351–362. <https://doi.org/10.1158/2159-8290.CD-12-0470/42295/AM/A-GENOME-SCALE-RNA-INTERFERENCE-SCREEN-IMPLICATES>
- Wickenden, J. A., Jin, H., Johnson, M., Gillings, A. S., Newson, C., Austin, M., Chell, S. D., Balmanno, K., Pritchard, C. A., & Cook, S. J. (2008). Colorectal cancer cells with the BRAFV600E mutation are addicted to the ERK1/2 pathway for growth factor-independent survival and repression of BIM. *Oncogene* 2008 27:57, 27(57), 7150–7161. <https://doi.org/10.1038/onc.2008.335>
- Willier, S., Butt, E., & Grunewald, T. G. P. (2013). Lysophosphatidic acid (LPA) signalling in cell migration and cancer invasion: A focussed review and analysis of LPA receptor gene expression on the basis of more than 1700 cancer microarrays. *Biology of the Cell*, 105(8), 317–333. <https://doi.org/10.1111/BOC.201300011>
- Wilusz, J. E., JnBaptiste, C. K., Lu, L. Y., Kuhn, C. D., Joshua-Tor, L., & Sharp, P. A. (2012). A triple helix stabilizes the 3' ends of long noncoding RNAs that lack poly(A) tails. *Genes & Development*, 26(21), 2392–2407. <https://doi.org/10.1101/GAD.204438.112>
- Yang, H., Cai, M. Y., Rong, H., Ma, L. R., & Xu, Y. L. (2021). ZNF667-AS1, a positively regulating MEGF10, inhibits the progression of uveal melanoma by modulating cellular aggressiveness. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 35(5), e22732. <https://doi.org/10.1002/JBT.22732>
- Yao, Z., Yaeger, R., Rodrik-Outmezguine, V. S., Tao, A., Torres, N. M., Chang, M. T., Drosten, M., Zhao, H., Cecchi, F., Hembrough, T., Michels, J., Baumert, H., Miles, L., Campbell, N. M., De Stanchina, E., Solit, D. B., Barbacid, M., Taylor, B. S., & Rosen, N. (2017). Tumours with class 3 BRAF mutants are sensitive to the inhibition of

- activated RAS. *Nature* 2017 548:7666, 548(7666), 234–238. <https://doi.org/10.1038/nature23291>
- Yu, G., Wang, L. G., Han, Y., & He, Q. Y. (2012). clusterProfiler: an R package for comparing biological themes among gene clusters. *Omics : a journal of integrative biology*, 16(5), 284–287. <https://doi.org/10.1089/OMI.2011.0118>
- Zaidi, M. R., Fisher, D. E., & Rizos, H. (2020). Biology of Melanocytes and Primary Melanoma. *Cutaneous Melanoma*, 3–40. https://doi.org/10.1007/978-3-030-05070-2_42
- Zanconato, F., Forcato, M., Battilana, G., Azzolin, L., Quaranta, E., Bodega, B., Rosato, A., Bicciato, S., Cordenonsi, M., & Piccolo, S. (2015). Genome-wide association between YAP/TAZ/TEAD and AP-1 at enhancers drives oncogenic growth. *Nature Cell Biology* 2015 17:9, 17(9), 1218–1227. <https://doi.org/10.1038/ncb3216>
- Zuckerman, B., & Ulitsky, I. (2019). Predictive models of subcellular localization of long RNAs. *RNA*, 25(5), 557–572. <https://doi.org/10.1261/RNA.068288.118>
- Zu, T., Wang, D., Xu, S., Lee, C. A. A., Zhen, E., Yoon, C. H., Abarzua, P., Wang, S., Frank, N. Y., Wu, X., Lian, C. G., & Murphy, G. F. (2020). ATF-3 expression inhibits melanoma growth by downregulating ERK and AKT pathways. *Laboratory Investigation* 2020 101:5, 101(5), 636–647. <https://doi.org/10.1038/s41374-020-00516-y>

8. Apêndice

Anexo 1 – Sequenciamento dos transcritos obtidos por RT-PCR com primer específico RMEL3_201.

>pGEM_RMEL3.1 - clone 2

```
TTACTCTCCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGGAGAACAGCCGATCCGAAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGG
CACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATA
ATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAAATATCAAGAAAAGAAGAAAACATGAGACCCTGAAAATAAAA
ACCTCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAATTCCAGTATGTTTGGCTTAATGTGGGTATTCCTGTGACAAAGAAGGCACACTACTCAG
CCAGCCAGAATGCACACTGACCACCCTGCAGGGTTTCAGTCACATGAGACATCTGGGTGATAGAGGGAAGTGTGGGGAATGGCTATCA
TTGATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGGGGACTAAGGCTTATTTTCTCCAGGCTTGCTTATGAAGAAGTTTATGCTATTTG
GAATAGATAAGGCTTATACACATAAAGTAACTGATACTCAATTATATGTAATTATGTTAGTTGGGGATAAGGCTAAGCTGTGTTATG
TAGTGACTCAAAAATGCGATGACTCAAACAAGATTGGAGCTTGTCTCTCCGGGAATGAATGATCCACACTCGGGGGCAGCTAGG
CTGCTGGGATCCAGGTTTCCTTACCTGTTGCTCTGTTATGGTTGAAGCTGGCTTATCCCAACCTCATTG
```

Legenda:

Amarela: Éxon 1 RMEL3_201

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

>pGEM_RMEL3.1- clone 3

```
TTACTCTCCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGAAATGCTGATTG
AATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTC
AATGAGGGGAGGATTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATAAATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGA
GGAAATATCAAGAAAAGAAGAAAACATGAGACCCTGAAAATAAAAACCTCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAATTCCAGTATGTTT
GCTTAATTGTTGGGTATTCCTGTGACAAAGAAGGCACACTACTCAGCCAGCCAGAATGCACACTGACCACCCTGCAGGGTTTCAGTCACA
TGAGACATCTGGGTGATAGAGGGAAGTGTGGGGAATGGCTATCATTGATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGGGGACTAAGGCTT
ATTTTCTCCAGGCTTGCTTATGAAGAAGTTTATGCTATTTGGAATAGATAAGGCTTATACACATAAAGTAACTGATACTCAATT
ATATGTAATTATGTTAGTTGGGGATAAGGCTAAGCTGTGTTATGTAAGTACTCAAAAATGCGATGACTCAAACAAGATTGGAGCTTG
TTTCTCTCCGGGAATGAATGATCCACACTCGGGGGCAGCTAGGCTGCTGGGATCCAGGTTTCCTTACCTGTTGCTCTGTTATGGTT
GAAGCTGGCTTATCCCAACCTCATTG
```

Legenda:

Amarela: Éxon 1 parcial (perda dos 43 nt finais)

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

>pGEM_RMEL3.2 - clone 2

```
TTACTCTCCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGGAGAACAGCCGATCCGAGCGTCTGCTGCTATGGACATGTGCTGCCCTGGGAAAAGTCCACTGAAGGTGGAT
GATGCAGATGAAAAGGCTACTTCACTTTTGGAAAGCTGCCTAATTCACTTCCAGGAGCAAACCTTTTTGATCCGTAGGATATGACTCAG
TAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAAT
CTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATAAATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCC
AAGAAAACCAGAGGAAATATCAAGAAAAGAAGAAAACATGAGACCCTGAAAATAAAAACCTCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAAT
TCCAGTATGTTTGGCTTAATTGTTGGGTATTCCTGTGACAAAGAAGGCACACTACTCAGCCAGCCAGAATGCACACTGACCACCCTGCAGG
GTTTCAGTCACATGAGACATCTGGGTGATAGAGGGAAGTGTGGGGAATGGCTATCATTGATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGG
GGACTAAGGCTTATTTTCTCCAGGCTTGCTTATGAAGAAGTTTATGCTATTTGGAATAGATAAAGCTTATACACATAAAGTAACT
TGATACTCAATTATATGTAATTATGTTAGTTGGGGATAAAGGCTAAGCTGTGTTATGTAAGTACTCAAAAATGCGATGACTCAACAG
```

ATTGGAGCTTGTCTCTCCGGGAATGAATGATCCCACACTCGGGGGCAGCTAGGCTGCTTGGGATCCAGGTTCCCTTCACCTGTGCT
CTGTATGGATGAGCTGGCTTATCCCACTCCAACCATTC

Legenda:

Amarela: Éxon 1 RMEL3_201

Marrom → Inclusão de 142 bp *final éxon 1 RMEL3_202*

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

Sublinhado → região final da leitura do sequenciamento, cheia de ruído.

>pGEM_RMEL3.2 - clone 5

TTACTCTCCCAGACTTGTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGGAGAACAGCCGATCCGCTTAGGTATCATGCCGGATTTCTGCACATTTTCGTGAAGACCATCTAGAAGCCC
ATGCCTGCTTATAACTGGCGAGATGGGATTATGGCTTGTCAAGCAGCAGAACACACCCAGTGTCTCCTCTCCTACAGAGCGTCTGCT
GCTATGGACATGTGCTGCCCTGGGAAAAGTCCACTGAAGGTGGATGATGCAGATGAAAAGGCTACTTCCACTTTTGGAAAGCTGCCTAA
TTCACTTCCAGGAGCAAACCTTTTGGATCCGTAGGATATGACTCAGTAATGCTGATTGAAGCTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCT
GGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCATGAGGGGAGGATTTTCGTTCCATCAGATG
GGCTTCCCTGACATAATTGCAAAGCTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAAATATCAAGAAAAGAAGAAAACATGAGA
CCCTGAAAATAAAAACCTCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAATTCCAGTATGTTTGTCTTAATTGTTGGGTATTCCTGTGACAAAAG
AAGGCCTACTCAGCCAGCCAGAATGCACTGACCACCACTGCAGGGTTTCAGTCACATGAGACATCTGGGTGATAGAGGGAAGTGTG
GGGGAATGGCTATCATTGATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGGGGACTAAAGCTTATTTTTTCTCCAGGCTTGTCTTATGAAG
AAGTTTTAGTCTATTTGGGAATAGATAAAGGCTTATACACATAAAGTAACTGATACTCAATTTATATGTAAATTATGTTTAGTTTTGG
GGGATAAGGCTAAAGCTGTGTATGTAGTGACTCAAAAATGCGATGGACTCAACCAGATTTGGCAGCTTGGCTTTCTCTCGGCAATGA
GTGGATCCCACCACTCGGGGGGCCAGGCCA

Legenda:

Amarela: Éxon 1 RMEL3_201

Marrom → Inclusão de 245 bp *final éxon 1 RMEL3_202*

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

Sublinhado → região final da leitura do sequenciamento com ruído.

>pGEM-T-RMEL3.3 - Plasmídeo 1 → 1050 bp

TTACTCTCCCAGACTTGTCTCAGCCTTTCTAGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGGAGAACAGCCGATCCGCTTAGGTGAGAGAAGTCTTAGGTATCATGCCGGATTTCTGCACATTTTCGTGA
AGACCATCTAGAAGCCCATGCCTGCTTATAACTGGCGAGATGGGATTATGGCTTGTCAAGCAGCAGAACACACCCAGTGTCTCCTCC
TACAGAGCGTCTGCTGCTATGGACATGTGCTGCCCTGGGAAAAGTCCACTGAAGGTGGATGATGCAGATGAAAAGGCTACTTCCACTT
TTGGAAGCTGCCTAATTCACTTCCAGGAGCAAACCTTTTGGATCGGTAGGATATGACTCAGTAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACT
GCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCATGAGGGGAGGATT
TCGTTCCATCAGATGGGCTTCCCTGACATAATTGCAAAGCTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAAATATCAAGAAA
GAAGAAAACATGAGACCCTGAAAATAAAAACCTCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAATTCCAGTATGTTTGTCTTAATTGTTGGGT
ATTCCTGTGACAAAAGAAGGCACTACTCAGCCAGCCAGAATGCACTGACCACCACTGCAGGGTTTCAGTCACATGAGACATCTGGGTG
ATAGAGGGAAGTGTGGGGAATGGCTATCATTGATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGGGGACTAAGGCTTATTTTTCTCCAGGCT
TGTCTTATGAAGAAGTTTTAGTCTATTTGGAATAGATAAAGGCTTATACACATAAAGTAACTGATACTCAATTTATATGTAAATTATGTT
AGTTGGGGATAAAGGCTAAGCTGTGTATGTAGTGACTCAAAAATGCGAATGAACTTCAACAAGATTGGAGGCTTGTCTTTTCTCTC
CCCGGGG

Legenda:

Amarela: Éxon 1 RMEL3_201

GTAGGTGAGAGAAGTG - Extensão Éxon 1 RMEL3_201 (Início íntron 1)

Marrom → Inclusão de 276 bp *final éxon 1 RMEL3_202*

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

Sublinhado → região final da leitura do sequenciamento com ruído.

>pGEM-T-RMEL3.3 - Plasmídeo 2 → 1069 bp

TTACTCTCCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGAGAACAGCCGATCCGCTTAGGTATCATGCCGGATTTCTGCACATTTTCGTGAAGACCATCTAGAAGCCC
ATGCCTGCTTATAACTGGCGAGATGGGATTATGGCTTGTCAAGCAGCAGAACACACCCAGTGTCTCCTCCTACAGAGCGTCTGCT
GCTATGGACATGTGCTGCCCTGGGAAAAGTCCACTGAAGGTGGATGATGCAGATGAAAAGGCTACTTCACTTTTGGAAGCTGCCTAA
TTCACCTCCAGGAGCAAACTTTTTGATCGAATGCCGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGTTGGAACAGACGATGGCAC
TGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTCGTTCCATCAGATGGGCTTCTTGACATAATT
GCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAAATATCAAGAAAAGAAGAAAACACGAGACCCTGAAAATAAAAACC
TCAACCCAGAAGGAGACCATGAAATAATTCCAGTATGTTTGCTTAATTGTTGGGTATTCTGTGACAAAGAAGGCACTACTCAGCCA
GCCAGAATGCACTGACCACCACTGCAGGGTTTCAGTCACATGAGACATCTGGGTGATAGAGGGAAGTGTGGGGAATGGCTATCATTC
ATGAGCCTGTATGTTCTAAGTGATCTGGAGACTAAGGCTATTTTTTCTCCAGGCTTGTCTTATGAAGAAGTTTTAGTCTATTTGGA
ATAGATAAAGGCTTATACACATAAAGTAACTGATACTCAATTATATGTAATTATGTTAGTTGGGGGATAAGGCTAAGCTGTGTTTAT
GTAGTGACTCAAAAATGCGATGACTCAAACAAGATTGCAGCTTTGTTTCTCCTCCGGGAATGATGATTCCCACACTTCGGGGGCGAG
CTAGGCTTGCCTGGGGAATCCAAAG

Legenda:

Amarela: Éxon 1 RMEL3_201

Marrom → Inclusão de 258 bp *final éxon 1 RMEL3_202*

Verde: Éxon 2 RMEL3_201

Rosa: Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)

Vermelho: Éxon 4 RMEL3_201

Sublinhado → região final da leitura do sequenciamento com ruído.

Anexo 2 - Sequenciamento dos transcritos obtidos por 5'RACE PCR

>pGEM_5RACE.1 clone 2

CAGTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACACACAGAAGGAAGAAGTCCGTGTGATAGTGGAGGCAGAGACT
GGAGTGATGCAGCTACAAGCCAAGGAACACCAATGATTGCCAGGAGTCTCCAGAAGCTAGGAAAAGAAATGCT
GATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACA
GAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTTTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATAAATTGCAA
GTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAA

>pGEM_5RACE.2 clone 1

GTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGCCTCATTGCCCCGTCAGGAGGATCTTACTCTCCCAGACTTGTTC
TCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATGTTTCT
CAGGTTATTTTGGAGAACAGCCGATCCGAAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTAGAA
CAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTTTCGT
TCCATCAGATGGGCTTCCTGACATAATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAA

>pGEM_5RACE.2 clone 6

GTGGTATCAACGCAGAGTACGCGGGGACACACAGAAGGAAGAAGTCCGTGTGATAGTGGAGGCAGAGACTGG
AGTGATGCAGCTACAAGCCAAGGAACACCAATGATTGCCAGGAGTCTCCAGAAGCTAGGAAAAGAAATGCTGA
TTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGGCACTGCAGAATCTTATGTGCACAGA
AGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTTTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATAAATTGCAAAGT
TAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACCAGAGGAA

Legenda

Primer Forward: 5RACE_Fw2

Primer Reverse: RMEL3-Ex3_Rv2 (meio éxon 3 RMEL3_201)

Preto: Éxon iniciado 1262pb antes do éxon 1 RMEL3_201

Verde Escuro: Região 26pb upstream antes do éxon 1 RMEL3_201

Amarela: Éxon 1

Verde: Éxon 2

Rosa: Éxon 3 (45 bases iniciais faltando)

Região upstream ao éxon 1 RMEL3 ISO_A

>chr5:57393748-57395907

CTAATCCAATGACTGGTGCCCTTATAAGAAGGCCAAGTGATCACACAGACACACACAGAAGGAAGAAGTCCG
TGTGATAGTGGAGGCAGAGACTGGAGTGATGCAGCTACAAGCCAAGGAACACCAATGATTGCCAGGAGTCTC
CAGAAGCTAGGAAAAGGCAAGAAAGAATCCTACCCTAGAATTTCCGGAGGGAGCATGGCTCTGCTGATACCT
TGATTTTGGACTTCCAGTTTCTAGACCTGTAAGAGAGTAACTTCTGTTCTTTAAGCCACCCAGTTTGTGGT
AATTTGTTATGGCAGCCCTAGGAAATGGATACAGTAGTGATGGGGAGTTTCTTCACTCTGATTGCTGTCA
TGTGATTGGCATTCCACTGTAACACACCTGGCCACTCACTCACTCACTCAGGGGAGGAAGAATGACTTAAAT
CTGCTTGTGACCTGGGAAGGATAAACTGGACACTTGTATATCAGCCTTTTCCCTTCTTTTTTCTCTTGGG
TGTGAATCACCAGAGAGCATGCAGTCTATGTGGGGAGGCCTGCAGAGGATCAGTATTACGAGGCCCCAG
GATTGCAATATAAGCAACATCTTCCAATATCGGCCCTTAGCAGTGATAAGTTTACATTTAATTGCCCCAGTG
TATTTTTTAATCTTATTTCTCAATTTGTTAAGTACTCAGCATGTATATGGATGGATTGAGGTGGGGAAAGGA

AAGCCCCTTTAGACTGGCAATAACCCTCCAAGTTCCTTCTGTTCTCAGTAAAGATTTGTTTAGTTTCCCTTG
AGAGGAACATTGTATGGAGAAAGGACACCCTGAGGGATGAATTAGTCCTCCTGTCTGCCTAGCCAGGATCAT
AATACCTCAGTCATACCCCACACACAAGAGAACACATTCAGTTTTTCATATCTTCCAGGAGAATGACTTCAAC
ACCTTCTGAAAGACCCCTGGAGTATTGAATACACTTTTTGTTACTTATCTTCCTTAAACGGCTGAGTTGATG
AAAAAAAAAAAAAAAAAGGTCTGGGATAGGTTAAGATTTTAAAAAACTTTTATCTTTAAATTTTCATTTATTATT
ATTATGTCTCAGTTTTACATTTTTATTTTGAATAATTATAGTTTTCACAGAAAATTACCAAAAATATATGGG
GAAGTCCTGTGTATCCTTCACCCAGTTTCTCTAATGGTAACATTTTGCCTGACTATAGAACATTATCAAAA
CCCAGACATTGGCATTGGTACAATTGGCAGAGTTTATTTAGCTTTCAAGGGTCAGTCTCTTCCTCATTTC
CCCCGTCAGGAGGATCTTACTCTCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGG
GGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATGTTTCTCAGGTTATTTTGAGAACAGCCGATCCG

Preto: Éxon iniciado 1262pb antes do éxon 1 RMEL3_201

Verde Escuro: Região 26pb upstream antes do éxon 1 RMEL3_201

Amarela: Éxon 1

Anexo 3 - Sequenciamento dos transcritos obtidos por 3

> pGEM_3RACE.1 clone 2

```
TTACTCTCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGAGAACAGCCGATCCGAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGG
CACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTTTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATA
ATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACAGAGGAAATATCAAGAAAGAAGAAAACATGAGACCCCTGAAAATAAAA
ACCTCAACCCAGAAGGTATGCCAAAGAAATCTCCAGGGCGACGGGGAGGGAGATGCAGATGCCATAGCTGTGAAACTAGCTTGGAGA
GCAGCAAATCCCAGAAGTGGGGCACAGAGGCTCCAGAAAAATGTTTCAAAGGGAAGGATGAAGGCTTATAGAATACCTGATTGCTTG
AATGCGTTGAAAAAATATTTATTCTTAGAAGTCTGGGAATGAATATTCATTAATATTTGGATGAAGAAAATAGACTTTTATTGGCCG
GGTGCAGTGGTTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTTGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAAGACCATCTGGC
TAACACAGTGAACCCCGTCTCTACTAAGAATACAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGATACCACTG
```

> pGEM_3RACE.2 clone 4

```
TTACTCTCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGAGAACAGCCGATCCGAAGAGGAAATTAAGACACAGAGATGTACAGAGGACACCATTTGAAGACACAGAGA
GAAGATGGCCACCTAAAAGCCCAGGGCAGAGGCTCAGAAGAAATCATCTCTTTGATCTTGGACTCTCGCCTCCAGAATCATGAGA
AAATAAATGTCTGTTATTTAAGTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
AAAGTACTCTGCGTTGATACCACTG
```

> pGEM_3RACE.3 clone 6

```
TTACTCTCCAGACTTGTTCTCAGCCTTTCTGGGGACAAATGAAGGAAGCAACTGGGGAGAAGAACTAACCAGAGGTTTGGAGATG
TTTCTCAGGTTATTTTGAGAACAGCCGATCCGAATGCTGATTGAATTGGCTTCTCACTGCATTTGTCAAGGCTGGAACAGACGATGG
CACTGCAGAATCTTATGTGCACAGAAGAAATCTACAGACATTCAATGAGGGGAGGATTTTCGTTCCATCAGATGGGCTTCCTGACATA
ATTGCAAAGTTAATATCAGCCCATGTGCTCCAAGAAAACAGAGGAAATATCAAGAAAGAAGAAAACATGAGACCCCTGAAAATAAAA
ACCTCAACCCAGAAGGTATGCCAAAGAAATCTCCAGGGCGACGGGGAGGGAGATGCAGATGCCATAGCTGTGAAACTAGCTTGGAGA
GCAGCAAATCCCAGAAGTGGGGCACAGAGGCTCCAGAAAAATGTTTCAAAGGGAAGGATGAAGGCTTATAGAATACCTGATTGCTTG
AATGCGTTGAAAAAATACTTATTCTTAGAAGTCTGGGAATGAATATTCATTAATATTTGGATGAAGAAAATAGACTTTTATTGGCCG
GGTGCAGTGGTTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTTTGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAAGACCATCTGGC
TAACACAGTGAACCCCGTCTCTACTAAGAATACAAAAAAAAAAAAAAAAAGTACTCTGCGTTGATACCACTG
```

Legenda

- Primer Forward:** GSP2-RMEL3_202_Fw (início éxon 1)
- Primer Reverse:** Q1 (adaptador oligo-dT)
- Amarela:** Éxon 1 RMEL3_201
- Verde:** Éxon 2 RMEL3_201
- Rosa:** Éxon 3 parcial RMEL3_201 (45 bases iniciais faltando)
- Azul:** Extensão éxon 3 RMEL3_201
- Cinza:** Éxon novo encontrado no íntron 1 (entre éxon 1-2)

>RMEL3-201 intron 1 Parcial - posição 12180:13034 nt

```
GACATTTTCTATGATTATATTAACAGAATTGAAGAGTCTGATCTACATAGACCCGCAAGAGAGTCAAAAATATACTGTGTATGTGTG
TGTGTATGTTTGTGTGTATATGTGTGTGCATGTGTGTGTGTGAGAGAGAGAGAGAGCGAGAGAGTGGCGTGAGTGAGAGAGAGAG
AGAGAGAGAAAGAGGAGTATGCCCAAACCGGGGAAGCCAGTCTGGCAGATGGTGTAATTTTAAGGCCCTGGCTGGGTGGTCAGCACCA
GCATGAGTCTGCATCTGCTGCAGTTAGTAGAAGCAAGAGCTGTAGGAAGGAAGAAAAGCCAGTGGATTTTTCTGGTTGGTTCTTGGAT
ATGTTTCAGGAGGTGTTACGGGCTGAACTATTTTATCCCCAATTCATATATTTGCAGCTCTAACTCCTGGTCCCTATGAATGTGACTA
TATTTGGAGATGGGGTCTTTAAAGAGGTAAGTGAATTAATAAAGTCAATTCAGGTGGCCCTTAATCCAATACTGTTTGTGTCTTTT
TAAGAAGAGGAAATTAAGACACAGAGATGTACAGAGGACACCATTTGAAGACACAGAGAGAAGATGGCCACCTAAAAGCCCAGGGCA
GAGGCCCTCAGAAGAAATCATCTCTTTGATCTTGGACTCTCGGCCCCAGAATCATGAGAAAATAAATGTCTGTTATTTAAGTCACTC
AGTATGTGGTACTTTGTTATGGCAGCCCTAGTGGACTAATAGAGGAGGATTCGTTTCCACAAGGAAGGCTGAAATCTTGACCAGGGA
GAAGCTGGTAGCTCCAGCCTGCAGCAACTATCTTTTCTTCATCTGGTGGCAGCTGGG
```

GTTTTCTCAGCTAGCATGGACCTAGAAAGAATTCTAGTAGCTGCCACATCCACTCTGGGGTTCATAATGGTGGGCTCTGGCCATTC
CCACTCCAGACACCTGTCACGAGTATTTGGGTTGAGGGCACATGCTCCGAGTGGATGTAGGATGGAAGTGGTCTCTTTCTTGGTGAT
TTCAGG

Cinza: Éxon novo encontrado no Íntron 1 (entre éxon 1-2)

>RMEL3-201 intron 3 Parcial - posição 1:1020 nt

GTATGCCAAAGAAATCTCCAGGGCGACGGGGAGGGAGATGCAGATGCCATAGCTGTGAAACTAGCTTGGAGAGCAGCAAATCCCAGA
AGTGGGGCACAGAGGCTCCAGAAAAATGTTTCAAAGGGAAGGATGAAGGCTTATAGAATACCTGATTGCTTGAATGCGTTGAAAAA
ATATTTATTCTAGAACTCTGGGAATGAATATTCATTAATATTGGATGAAGAAAAATAGACTTTTATTGGCCGGGTGCAGTGGTTCAT
GCCTGTAATCCCAGCACTTTTGGAGGCCGAGGCGGGCGGATCACGAGGTCAGGAGATCAAGACCATCCTGGCTAACACAGTGAACC
CCGTCTCTACTAAGAATACAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGCGGGAGCCTGTAG
TCTCAGCTACTTGGGAAGCTGAAGCAGGAGAATGGCGTGAACCCGGGAGGCGGAGCTTGCAGTGAGCAGAGATCGTGCCACTGCACT
CCAGCCTGGGTGGCAGAGCCAGACTCCGTCTCAAAAAAAAAAAAAAATAAAAAAAAAAAAAAATTAGACTCTCATTAAGCAGAAAAAATAT
TTTGGTAATCTTACCATCCAGAGATAATCACTATTCTTGTTTTTTACGTACATAGTTGAGACCTTTATGTATGTTAAATTTTGTATCT
TTCTCACACATCCATATCACGAACATTTCTCTAAATTATATAAAACATAAGCAAGAAATAAATTGATAAAGAGGAGCTTATGGTAC
ATATCTTTTATAGGTCCTTTCTTCTATAAGGTAAAATAATTAATGAATTGGACTAGATACAATATTCTGA
AATTGGGTGGAGGGTAGTGCCAATTTTAAATTATCCTGTCTACCTATCAAGTCATGTTTGTCTTTTATTGGGTGGGTGCTCAGAATAT
GTGATCCTTGAAGAAATAAGCATCCATGTCTATGGAGACATGACATCACCTTTGGGAAAATGACTTTGTGACAATTTATCTTACTGT
ATTTGA

Azul: Extensão éxon 3 RMEL3_201

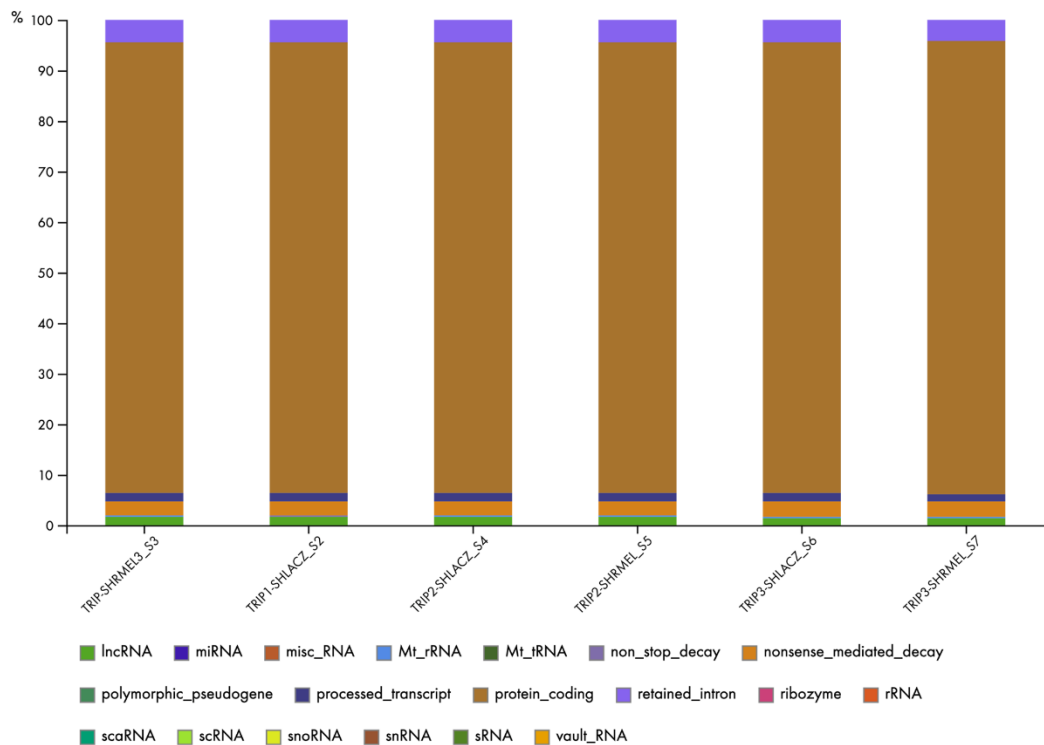
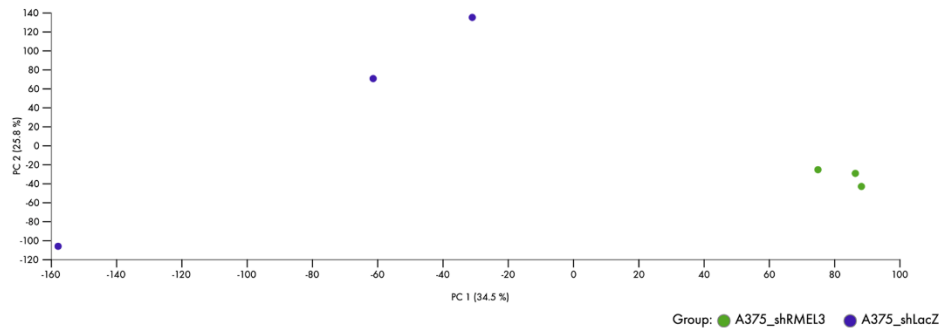
Anexo 4 – Resultados técnicos sequenciamento em larga escala – RNAseq das amostras de A375 shRMEL3 e A375 sh LacZ

Mapping statistics

Quality control summary

Sample name	Reads	Reads after trim	Mapped in pairs	Mapped to total RNA
TRIP-SHRMEL3_S3	59,508,344	59,323,902	95.95%	0.27%
TRIP1-SHLACZ_S2	60,055,580	59,845,014	95.49%	0.25%
TRIP2-SHLACZ_S4	62,751,692	62,547,560	95.36%	0.26%
TRIP2-SHRMEL_S5	50,335,434	50,059,732	95.16%	0.28%
TRIP3-SHLACZ_S6	47,256,620	47,100,550	95.79%	0.28%
TRIP3-SHRMEL_S7	52,794,680	52,640,724	95.98%	0.28%

Sample name	Reads	Paired (yes/no)	Reads mapped in pairs	Strand specific setting	Forward % of reads mapped	Reverse % of reads mapped	Ignored reads % (wrong strand)
TRIP-SHRMEL3_S3	59,323,902	Yes	95.95%	Reverse	0.00%	100%	1.08%
TRIP1-SHLACZ_S2	59,845,014	Yes	95.49%	Reverse	0.00%	100%	1.15%
TRIP2-SHLACZ_S4	62,547,560	Yes	95.36%	Reverse	0.00%	100%	1.15%
TRIP2-SHRMEL_S5	50,059,732	Yes	95.16%	Reverse	0.00%	100%	1.08%
TRIP3-SHLACZ_S6	47,100,550	Yes	95.79%	Reverse	0.00%	100%	1.03%
TRIP3-SHRMEL_S7	52,640,724	Yes	95.98%	Reverse	0.00%	100%	1.05%



Sample name	lincRNA	miRNA	misc_RNA	Mt_rRNA	Mt_rRNA	non_stop_decay	nonsense_mediated_decay	polymorphic_pseudogene	processed_transcript	protein_coding	retained_intron	ribozyme	rRNA	scaRNA	scRNA	snoRNA	snRNA	sRNA	vault_RNA
TRIP-SHRMEL3_S3	1.59%	0.00%	0.00%	0.27%	0.00%	0.01%	2.84%	0.00%	1.64%	89.28%	4.36%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
TRIP1-SHLACZ_S2	1.55%	0.00%	0.00%	0.25%	0.00%	0.01%	2.89%	0.00%	1.68%	89.29%	4.32%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
TRIP2-SHLACZ_S4	1.57%	0.00%	0.00%	0.26%	0.00%	0.01%	2.87%	0.00%	1.62%	89.33%	4.32%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
TRIP2-SHRMEL_S5	1.61%	0.00%	0.00%	0.28%	0.00%	0.01%	2.89%	0.00%	1.67%	89.19%	4.34%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
TRIP3-SHLACZ_S6	1.51%	0.00%	0.00%	0.28%	0.00%	0.01%	2.81%	0.00%	1.73%	89.32%	4.34%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%
TRIP3-SHRMEL_S7	1.51%	0.00%	0.00%	0.28%	0.00%	0.01%	2.83%	0.00%	1.60%	89.58%	4.18%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%	0.00%

Tabela suplementar 1 - 20 regiões de ARAF com maior interação com RMEL3 (T-A375_1)

Região Proteína	Região RNA	Propensão de Interação	Poder Discriminativo	Score Normalizado
301-352	752-803	10,48	32	3,11
51-102	752-803	9,69	28	2,92
351-402	752-803	9,64	28	2,9
201-252	627-678	9,61	28	2,9
166-217	752-803	9,57	28	2,89
326-377	626-677	9,21	28	2,8
301-352	752-803	9,1	28	2,77
391-442	752-803	8,88	26	2,72
76-127	752-803	8,79	26	2,69
51-102	627-678	8,74	26	2,68
366-417	626-677	8,41	26	2,6
241-292	752-803	8,31	26	2,57
116-167	752-803	8,23	26	2,55
141-192	751-802	8,18	26	2,54
316-367	752-803	8,16	26	2,54
126-177	752-803	8,02	26	2,5
251-302	627-678	7,54	24	2,38
401-452	751-802	7,53	24	2,38
301-352	752-803	7,52	24	2,38
26-77	751-802	7,5	24	2,37

Tabela suplementar 2 - 20 regiões de MST2 com maior interação com RMEL3 (T-A375_1)

Região proteína	Região RNA	Propensão de Interação	Poder Discriminativo	Score Normalizado
301-352	752-803	13,14	37	3,58
51-102	752-803	12,46	35	3,42
351-402	752-803	9,67	28	2,78
201-252	752-803	9,54	28	2,75
166-217	752-803	8,76	26	2,58
326-377	752-803	8,71	26	2,56
301-352	752-803	8,7	26	2,56
391-442	752-803	8,67	26	2,56
76-127	752-803	8,39	26	2,49
51-102	751-802	8,28	26	2,47
366-417	752-803	8,13	26	2,43
241-292	751-802	8,01	26	2,40
116-167	752-803	7,79	24	2,35
141-192	752-803	7,66	24	2,32
316-367	752-803	7,36	24	2,26
126-177	752-803	7,05	24	2,18
251-302	752-803	6,95	22	2,16
401-452	752-803	6,83	22	2,13

301-352	451-502	6,83	22	2,13
26-77	752-803	6,62	22	2,09

Tabela suplementar 3 - 20 regiões de FAM83D com maior interação com RMEL3 (T-A375_1)

Região Proteína	Região RNA	Propensão de Interação	Poder Discriminativo	Score Normalizado
201-252	752-803	11,21	33	3,43
235-286	752-803	10,1	32	3,15
385-436	752-803	9,32	28	2,95
276-327	752-803	9,28	28	2,94
60-111	752-803	8,97	28	2,86
151-202	752-803	8,83	26	2,82
160-211	752-803	8,57	26	2,76
35-86	752-803	8,51	26	2,74
226-277	752-803	7,68	24	2,53
401-452	752-803	7,67	24	2,53
285-336	752-803	7,49	24	2,48
201-252	751-802	7,46	21	2,48
510-561	752-803	7,43	24	2,47
376-427	752-803	7,42	24	2,47
110-161	752-803	7,2	24	2,41
335-386	752-803	7,16	24	2,4
101-152	752-803	6,97	22	2,35
235-286	751-802	6,73	22	2,29
310-361	752-803	6,45	22	2,22
135-186	627-678	6,22	22	2,16

Tabela suplementar 4 - Lista de genes identificados como diferencialmente expressos (\log_2 fold change <-1 ou >1; FDR p-value <0,05) no sequenciamento em larga escala das células A375 shRMEL3 #4/A375 shLacZ estimulas 4h com 10%SFB após privação de mitógenos por 72h.

Gene	\log_2 fold change	FDR p-value	Gene	\log_2 fold change	FDR p-value	Gene	\log_2 fold change	FDR p-value
KBTBD11-OT1_1	20,6693	8,62E-12	ABHD13	1,2000	6,45E-03	CEP20	-1,3221	2,57E-06
UNC5D	18,9061	4,19E-42	TRIM37	1,1998	5,71E-03	TLE3	-1,3225	5,78E-03
UBE2F-SCLY	10,7952	3,87E-02	ARMC6	1,1998	3,66E-03	DLG3	-1,3234	1,02E-02
MEGF10	10,1808	1,06E-09	FIP1L1	1,1997	3,00E-03	SFXN3	-1,3235	2,17E-06
CD36	9,6722	1,25E-04	PKD2	1,1995	3,85E-03	KIF5C	-1,3240	2,76E-02
VAT1L	9,2153	6,69E-06	MSH6	1,1995	2,03E-03	ALDOC	-1,3244	1,07E-03
AC097637.1	9,0235	2,83E-02	RRP1B	1,1992	3,02E-03	TMCC3	-1,3246	6,08E-03
THBD	9,0129	1,22E-03	FMN2	1,1992	8,31E-03	PMEP A1	-1,3249	1,14E-07
PRG4	8,7775	6,27E-08	USP12	1,1991	4,44E-03	RPS12	-1,3250	9,75E-04
DCC	8,3908	2,03E-23	TMX4	1,1991	2,74E-03	PLAAT3	-1,3254	3,66E-03
OSTN	7,8371	3,96E-02	EIF4EBP2	1,1990	3,01E-03	AC068888.1	-1,3259	2,31E-02
IGFBP5	7,2223	1,23E-284	RNF6	1,1984	4,69E-03	BIRC5	-1,3260	1,53E-06
NPTX2	6,5872	6,27E-36	IFI16	1,1978	2,79E-03	BHLHE40	-1,3260	2,47E-03
HCN1	6,5709	1,20E-11	MAFG	1,1976	2,99E-03	LAMA4	-1,3261	7,80E-08
PLN	6,3209	1,27E-02	PLCG1	1,1974	3,21E-03	CDK16	-1,3261	2,40E-07
ITGA8	5,8154	4,41E-02	DOT1L	1,1973	7,43E-03	MLLT11	-1,3263	1,63E-05
AL138752.2	5,4315	3,54E-03	HLCS	1,1970	6,54E-03	ZFP37	-1,3263	1,90E-02
AL136295.4	5,3942	2,56E-04	PDLIM5	1,1968	3,35E-03	PRR11	-1,3264	1,85E-03
SSX2	5,1053	1,52E-04	MNT	1,1966	7,33E-03	CORO1C	-1,3269	1,36E-07
AC068896.1	4,8565	4,45E-02	DDIT3	1,1964	3,96E-03	ECI2	-1,3269	3,02E-03
KLRC2	4,6968	6,02E-03	NOC3L	1,1963	3,36E-03	CKAP2L	-1,3272	1,78E-03
KRTAP2-3	4,6421	4,65E-07	WIZ	1,1958	5,13E-03	POLR2J4	-1,3281	2,04E-02
CT45A9	4,5051	2,31E-02	GNL2	1,1954	2,99E-03	MEIS1	-1,3281	1,43E-02
TNFRSF6B	4,4483	3,91E-02	DUSP3	1,1951	1,20E-02	WWP2	-1,3282	1,51E-07
IRX1	4,3164	5,34E-03	MYO19	1,1949	3,98E-03	PGK1	-1,3283	3,46E-08
LIPG	4,1686	3,12E-02	SENP6	1,1948	5,10E-03	C12orf76	-1,3310	7,12E-03
RIMBP3B	4,0502	4,51E-02	FSTL3	1,1946	4,46E-03	SEC24D	-1,3315	2,94E-03
AC242842.3	3,9298	1,05E-02	LPCAT1	1,1943	6,18E-03	SNPH	-1,3316	4,71E-02
DCLK1	3,7594	4,04E-12	MOCOS	1,1939	2,85E-03	KCNN4	-1,3320	1,06E-03
PPP1R1B	3,6452	1,66E-33	FARSB	1,1936	6,46E-03	CABLES1	-1,3322	4,21E-03
SERPINE1	3,5159	1,14E-16	JPT2	1,1931	3,54E-03	FHDC1	-1,3327	1,25E-02
FIBCD1	3,5148	9,79E-03	NLE1	1,1928	9,81E-03	SEMA3E	-1,3330	1,81E-02
MTUS2	3,4680	2,03E-02	CT45A5	1,1926	9,99E-03	ITPR2	-1,3338	1,53E-03
AREG	3,4673	4,50E-52	TMEM192	1,1922	1,18E-02	ZMYM3	-1,3344	9,63E-06
BGLAP	3,4188	3,17E-02	PPRC1	1,1918	4,03E-03	TCEAL8	-1,3346	3,25E-03
PDGFD	3,3180	1,78E-02	AJUBA	1,1916	6,05E-03	VAMP5	-1,3348	8,65E-03
PTPRO	3,2810	1,54E-07	POLR1G	1,1915	1,14E-02	PTPRM	-1,3350	1,43E-06
PDE8B	3,2733	8,57E-18	ADGRG1	1,1915	3,87E-03	TROAP	-1,3354	3,40E-03
GAGE12J	3,2580	6,86E-03	GLRX2	1,1912	7,57E-03	CDCA3	-1,3359	3,33E-05
PDE4B	3,2574	9,21E-40	PIEZO1	1,1909	3,69E-03	ABTB1	-1,3359	3,73E-03
RTL1	3,2128	3,66E-21	VCL	1,1905	3,25E-03	HOXA3	-1,3363	9,80E-03

FLG	3,2111	1,83E-02	PGRMC1	1,1904	7,98E-03	NUMB	-1,3365	1,18E-06
GJB2	3,2080	4,42E-02	PFAS	1,1903	5,84E-03	ETNK2	-1,3374	9,47E-03
C4B	3,1731	1,38E-06	ITGA3	1,1897	2,73E-03	LRRC23	-1,3375	1,11E-02
ADCYAP1	3,1636	1,27E-05	TRMT6	1,1895	5,00E-03	LINC00665	-1,3378	1,99E-03
PCSK1	3,1522	6,69E-53	TUBE1	1,1893	7,95E-03	PSRC1	-1,3381	4,40E-03
ARMCX5-GPRASP2_2	3,0574	3,91E-02	CEBPZ	1,1886	3,97E-03	BCAM	-1,3382	2,30E-03
ILDR2	3,0217	1,43E-02	PNO1	1,1886	7,09E-03	HSD17B11	-1,3384	2,30E-06
MAPK4	3,0109	4,13E-17	ZCCHC3	1,1882	7,12E-03	EHD3	-1,3388	1,18E-03
MAL2	3,0048	7,95E-09	IL11	1,1878	5,70E-03	ZCCHC17	-1,3394	3,70E-07
C15orf62	2,9703	8,96E-08	RFC3	1,1878	5,70E-03	TNNT1	-1,3413	1,40E-03
RGPD6	2,9263	1,04E-02	STK32B	1,1877	8,17E-03	IQGAP3	-1,3436	6,19E-08
COL4A6	2,9175	6,84E-07	SKP2	1,1876	6,67E-03	DSC3	-1,3438	3,70E-02
PCDH7	2,9150	6,38E-06	NAA40	1,1875	1,33E-02	CD27-AS1	-1,3439	9,38E-03
MEGF6	2,8688	3,22E-09	WDR3	1,1867	4,07E-03	MANCR	-1,3439	2,48E-02
CEACAM1	2,7475	6,32E-10	CYTH1	1,1866	3,43E-02	NUF2	-1,3443	4,51E-07
TFF2	2,6544	2,58E-02	PLEKHA5	1,1858	2,71E-02	PFKFB4	-1,3446	3,00E-07
UBE2QL1	2,6416	6,84E-06	AP3S2	1,1841	1,46E-02	HNRNPA1P48	-1,3448	2,81E-03
H2AC18	2,6368	1,82E-09	RBFOX2	1,1839	7,75E-03	KIAA1549L	-1,3465	7,24E-08
AC118553.2	2,5866	6,43E-09	LIG1	1,1836	1,16E-02	MIR3142HG	-1,3468	1,34E-03
TSPAN1	2,5598	2,09E-02	DUSP4	1,1835	4,13E-03	HJURP	-1,3473	3,95E-07
ANKRD1	2,5324	2,66E-21	SECISBP2	1,1834	7,51E-03	SYNM	-1,3475	6,59E-08
MAGEA1	2,4859	2,39E-04	CRLF3	1,1829	1,79E-02	SEL1L3	-1,3477	1,00E-06
SERPINI1	2,4695	1,06E-03	TSTD2	1,1827	1,21E-02	PREX1	-1,3480	1,46E-03
TRPC3	2,4654	3,00E-03	TRIM13	1,1821	1,86E-02	NUP58	-1,3483	3,64E-08
ZNF704	2,4644	9,50E-04	MED10	1,1821	1,76E-02	ARHGAP26	-1,3483	3,30E-03
CHSY3	2,4483	1,03E-04	EIF4G3	1,1820	5,71E-03	MRPS6	-1,3497	5,27E-04
SORCS1	2,4291	9,02E-26	B4GALT5	1,1809	7,21E-03	ZNF585A	-1,3514	3,29E-03
NTSR1	2,4213	1,86E-21	LIF	1,1808	5,77E-03	NDFIP1	-1,3532	5,14E-08
SPTB	2,3954	5,52E-05	NOP56	1,1803	5,45E-03	HLA-A	-1,3542	3,24E-04
FREM1	2,3940	1,97E-04	GDE1	1,1794	1,35E-02	DPYD	-1,3544	5,16E-07
ITGA1	2,3910	8,09E-33	RBM26	1,1793	9,55E-03	TMEM182	-1,3563	3,62E-02
ZIC5	2,3814	1,29E-02	TPP2	1,1789	1,04E-02	SCAT8	-1,3573	3,83E-03
ROR1	2,3760	2,21E-05	PCNX3	1,1785	8,86E-03	SNTB2	-1,3580	1,09E-08
FAM166C	2,3601	4,04E-02	ICMT	1,1785	7,48E-03	C3	-1,3581	5,13E-09
RASEF	2,3314	4,49E-03	RCL1	1,1779	1,55E-02	WSB2	-1,3585	9,01E-08
EPHA3	2,3297	1,37E-57	RPP14	1,1779	2,21E-02	IFNGR2	-1,3589	6,45E-08
C16orf54	2,3212	3,31E-02	EHD1	1,1775	1,03E-02	RNF125	-1,3589	3,24E-08
APOD	2,3125	2,02E-09	DYRK2	1,1770	1,92E-02	LAMB3	-1,3594	4,21E-03
GPRIN3	2,2979	5,70E-03	KIAA0040	1,1770	1,39E-02	IFI30	-1,3599	1,01E-02
VCAN	2,2971	8,89E-04	CRTC3	1,1766	2,72E-02	ST6GAL1	-1,3616	1,23E-08
S100P	2,2894	9,47E-03	SUPT20H	1,1765	1,41E-02	LZTS3	-1,3633	1,12E-02
COLEC12	2,2615	4,18E-05	EMG1	1,1759	1,13E-02	RAB13	-1,3643	2,32E-04
TGFB2	2,2585	5,41E-03	UNG	1,1757	1,05E-02	PLAT	-1,3672	1,68E-09
IKZF3	2,2441	3,20E-02	NAXD	1,1756	1,36E-02	ZNF577	-1,3688	2,26E-03
GDF15	2,2413	5,57E-19	POLD3	1,1755	1,59E-02	UGP2	-1,3702	6,03E-08
H2BC11	2,2354	8,20E-04	ACAT2	1,1751	1,50E-02	CPE	-1,3711	9,44E-04
AP002373.1	2,2163	2,64E-02	MPHOSPH8	1,1749	1,32E-02	CLIP3	-1,3715	6,71E-07
MUC5AC	2,2162	4,52E-04	FOXC1	1,1749	3,23E-02	RARG	-1,3723	3,69E-04
HECW2	2,2030	2,55E-02	PON2	1,1745	1,96E-02	KLF6	-1,3736	2,07E-08

RELN	2,1957	4,90E-02	PEX26	1,1736	2,09E-02	GXYLT2	-1,3737	1,25E-02
ADAMTSL3	2,1938	5,89E-03	PSMC3IP	1,1735	2,03E-02	FBXO27	-1,3742	5,27E-04
GATA3	2,1935	4,17E-04	DGCR8	1,1733	1,25E-02	HMMR	-1,3742	6,15E-04
QPRT	2,1888	4,20E-03	E2F5	1,1733	4,02E-02	ARHGEF6	-1,3743	2,93E-03
HS6ST3	2,1858	7,65E-07	MCM3	1,1733	9,18E-03	RCN3	-1,3774	1,83E-02
EXOC3L2	2,1842	9,99E-05	B4GALT1	1,1731	1,32E-02	IL24	-1,3790	4,84E-10
CPA4	2,1811	1,28E-19	PRPF40A	1,1726	1,15E-02	AC078881.1	-1,3823	4,69E-02
UNC13A	2,1749	1,72E-22	REXO4	1,1726	2,08E-02	LGR4	-1,3829	1,72E-03
MUC15	2,1702	4,09E-03	RHBDD2	1,1725	2,18E-02	SPAG5	-1,3836	7,04E-09
XYLT1	2,1570	2,48E-19	CAD	1,1724	1,12E-02	USP11	-1,3838	3,38E-10
IRS4	2,1355	3,63E-09	CHORDC1	1,1723	1,56E-02	SECTM1	-1,3839	8,50E-04
MYH15	2,1219	5,01E-14	NIP7	1,1722	1,06E-02	ZNF880	-1,3847	1,12E-02
GCOM1	2,1092	3,27E-03	PUS1	1,1720	2,34E-02	LPXN	-1,3853	2,64E-08
MMP1	2,1046	9,04E-05	ANKRD27	1,1719	2,42E-02	CD40	-1,3860	3,83E-02
F2RL1	2,0848	2,24E-03	RBM25	1,1709	1,17E-02	PTTG1	-1,3862	1,69E-04
PROX1	2,0601	6,47E-05	NIPAL3	1,1707	1,30E-02	HLA-C	-1,3874	1,04E-04
ABCA12	2,0546	3,46E-02	POLR2D	1,1707	1,73E-02	TXNDC12	-1,3875	3,62E-09
SORL1	2,0353	6,74E-05	C12orf29	1,1703	2,23E-02	MANBA	-1,3877	6,22E-04
B3GALT1	2,0166	9,22E-03	CLCC1	1,1702	2,43E-02	ZMYND8	-1,3881	8,36E-10
TRABD2B	2,0148	3,19E-04	VARS1	1,1702	1,43E-02	TANC2	-1,3893	1,29E-04
KCNQ5	2,0148	1,43E-13	FBXO22	1,1700	1,65E-02	ABCA5	-1,3895	3,14E-03
TAGLN	1,9863	6,30E-08	PPP1R15A	1,1697	1,17E-02	KANK1	-1,3923	1,45E-09
AL360181.3	1,9843	3,96E-02	RFC5	1,1695	2,34E-02	PLEKHA1	-1,3945	8,67E-09
EIF3CL	1,9826	2,01E-09	PRDM4	1,1690	2,29E-02	FCGR2A	-1,3956	5,36E-04
HCN2	1,9820	2,85E-03	FAM133B	1,1689	2,62E-02	LINC02119	-1,3956	1,48E-03
KLF14	1,9804	3,49E-06	DDR1	1,1687	1,19E-02	ELMO1	-1,3956	6,29E-04
PPAN-P2RY11	1,9746	2,03E-02	UFM1	1,1685	1,44E-02	BMT2	-1,3970	1,08E-03
FAM83H	1,9528	1,36E-02	TP53RK	1,1684	2,96E-02	DLG4	-1,3971	2,06E-08
AC010323.1	1,9381	3,12E-02	NCDN	1,1683	1,69E-02	APOL2	-1,3984	2,42E-02
LIN28B	1,9283	3,87E-05	RNF157	1,1683	4,47E-02	DUSP10	-1,3990	2,69E-09
TMEM200A	1,9199	2,79E-03	PIGM	1,1672	1,83E-02	LPCAT2	-1,4003	2,13E-09
COL9A1	1,9186	4,80E-02	GPATCH4	1,1671	1,32E-02	GJB3	-1,4004	1,21E-03
EDNRA	1,9144	1,48E-02	TCF19	1,1665	2,88E-02	GSDMB	-1,4009	1,29E-03
INSYN2B	1,9127	2,85E-02	MTMR6	1,1663	2,62E-02	BUB1	-1,4019	2,00E-04
EPHA7	1,8923	3,36E-06	KATNB1	1,1660	4,78E-02	ZNF844	-1,4032	6,92E-03
VSNL1	1,8814	4,07E-03	GIT1	1,1657	1,54E-02	CITED2	-1,4033	1,87E-04
CHGB	1,8738	6,23E-03	ATXN10	1,1655	2,14E-02	ANKRD30B	-1,4036	2,42E-02
HKDC1	1,8701	6,29E-04	SMG5	1,1652	1,33E-02	LINC02614	-1,4038	2,00E-02
ADARB2	1,8678	1,80E-07	LPGAT1	1,1651	1,45E-02	CAPG	-1,4071	4,87E-05
PRRX1	1,8631	3,41E-36	RABGAP1	1,1651	2,37E-02	LINC01089	-1,4071	1,42E-03
BCL7A	1,8620	3,13E-06	TBC1D16	1,1650	2,27E-02	ETHE1	-1,4078	1,19E-04
KCNH8	1,8578	5,46E-03	ESD	1,1647	1,83E-02	HSPB1	-1,4085	5,89E-05
IL19	1,8545	4,09E-10	GATAD2A	1,1647	1,71E-02	GTSE1	-1,4085	4,44E-04
RORB	1,8478	4,87E-05	NADK2	1,1645	4,95E-02	CDKN3	-1,4092	7,03E-04
RGS4	1,8456	4,99E-02	MRTO4	1,1644	1,74E-02	UTP14C	-1,4096	2,05E-03
CHN2	1,8388	2,33E-02	RIOK1	1,1644	2,51E-02	SAT1	-1,4100	1,09E-04
TGFBI	1,8381	4,12E-14	USP1	1,1643	1,52E-02	FZD1	-1,4104	1,11E-09
TNS1	1,8321	3,31E-04	GPD1L	1,1638	3,74E-02	NEK2	-1,4120	2,01E-04
DNAH9	1,8283	3,35E-02	RHOQ	1,1637	2,15E-02	FBXO32	-1,4126	4,93E-04

AC105052.3	1,8226	3,12E-02	POLR3D	1,1636	2,18E-02	PLEKHA4	-1,4127	4,28E-10
HMX3	1,8168	2,76E-02	TMEM64	1,1635	4,41E-02	DLGAP5	-1,4130	2,64E-04
SLC16A10	1,8166	1,56E-02	OGDH	1,1634	2,06E-02	SLC13A3	-1,4140	3,86E-02
PLEKHA7	1,8156	7,18E-03	E2F3	1,1632	3,13E-02	DACT1	-1,4143	1,77E-02
SLAIN1	1,8069	1,01E-11	TRIM56	1,1632	2,63E-02	NBPF3	-1,4148	3,36E-04
LRP3	1,7976	3,66E-02	SYNJ2	1,1630	2,59E-02	P3H2	-1,4149	1,68E-09
INPP5D	1,7974	1,14E-02	SAE1	1,1626	1,77E-02	DYNLT3	-1,4167	3,43E-11
PPARGC1B	1,7918	5,74E-06	TRMT13	1,1625	2,60E-02	TPT1-AS1	-1,4168	3,43E-04
SULF2	1,7868	1,49E-29	SBF1	1,1625	2,02E-02	CD9	-1,4178	3,72E-11
NTRK2	1,7868	4,87E-02	POLR3E	1,1623	2,27E-02	S100A1	-1,4180	3,23E-04
HRK	1,7837	8,05E-03	GINS2	1,1622	3,46E-02	NFATC4	-1,4182	1,88E-02
TBC1D30	1,7819	6,60E-05	PUS7	1,1620	3,16E-02	AC009133.6	-1,4188	2,28E-02
SLC6A20	1,7810	4,79E-02	GNPNAT1	1,1619	2,43E-02	PTGR1	-1,4201	6,07E-04
F2R	1,7736	1,06E-13	GTPBP2	1,1619	1,92E-02	FBN1	-1,4205	6,98E-05
PCDHA12	1,7628	2,58E-03	ARHGEF2	1,1619	1,33E-02	ICA1	-1,4209	2,73E-02
LONRF3	1,7559	1,00E-05	SETD6	1,1616	3,40E-02	MMP15	-1,4216	5,17E-03
IGFN1	1,7526	4,21E-06	PCK2	1,1615	2,59E-02	ZNF585B	-1,4217	6,61E-04
BTBD11	1,7503	2,23E-04	GOT1	1,1613	2,03E-02	CYP27C1	-1,4223	5,37E-03
H2BC12	1,7500	2,90E-10	RBM14	1,1613	2,96E-02	SIX5	-1,4230	3,07E-04
IGFBP2	1,7467	3,07E-11	TYRO3	1,1612	3,96E-02	RGS10	-1,4231	8,50E-04
ADGRL3	1,7459	1,37E-03	PTP4A2	1,1608	1,59E-02	PIMREG	-1,4247	7,39E-04
TENM2	1,7427	3,27E-05	PNN	1,1608	1,82E-02	LINC01060	-1,4265	2,13E-04
AOPEP	1,7415	1,95E-11	ASF1B	1,1606	2,80E-02	TRIM9	-1,4268	4,18E-04
SPP1	1,7398	3,13E-10	GMPS	1,1606	1,88E-02	FGD4	-1,4277	2,41E-04
F2RL2	1,7352	1,72E-08	NOLC1	1,1605	1,55E-02	PCDH1	-1,4280	3,15E-11
PCDHGB1	1,7344	1,34E-04	ELK3	1,1603	2,03E-02	FZD7	-1,4280	1,16E-04
SVEP1	1,7341	3,62E-04	PRKAB2	1,1600	3,42E-02	ZNF608	-1,4282	2,84E-04
L3MBTL3	1,7324	3,64E-02	ADCY3	1,1599	3,33E-02	ADAMTS6	-1,4283	2,09E-03
MEST	1,7304	1,69E-04	NUDCD1	1,1597	3,19E-02	MYRF	-1,4283	2,98E-04
AR	1,7219	1,51E-02	INAFM2	1,1592	4,09E-02	LOXL2	-1,4284	1,15E-11
PALLD	1,7191	2,21E-07	TRAF3	1,1591	3,69E-02	DSEL	-1,4309	3,47E-04
KCNMB3	1,7184	1,35E-02	PYCR2	1,1590	2,06E-02	FAM20A	-1,4317	8,65E-05
IFITM2	1,7160	1,15E-02	KNOP1	1,1590	2,67E-02	ARG2	-1,4333	7,40E-04
NTN4	1,7152	3,50E-08	HDGFL3	1,1587	3,44E-02	ZNF888	-1,4344	1,73E-02
PODXL2	1,7066	6,02E-07	C2orf68	1,1586	3,04E-02	CITED4	-1,4352	1,49E-03
TMEM255B	1,7055	1,33E-08	GNA11	1,1586	2,70E-02	CENPA	-1,4358	3,21E-04
HPDL	1,6957	2,01E-05	DNAJC2	1,1584	3,08E-02	MLLT3	-1,4363	8,06E-04
PRELID2	1,6940	2,67E-02	LUC7L	1,1583	3,34E-02	GAS2L3	-1,4365	7,29E-05
ANKEF1	1,6938	6,81E-03	MICU2	1,1582	3,10E-02	CHN1	-1,4368	7,55E-04
GPRIN1	1,6931	3,23E-08	SMG7	1,1582	2,01E-02	TSPAN33	-1,4371	2,07E-02
BTG2	1,6873	2,28E-10	UTP4	1,1581	2,23E-02	PRSS33	-1,4379	1,13E-03
SLC24A3	1,6867	1,35E-09	TFAM	1,1581	2,53E-02	CTSS	-1,4390	2,33E-02
MACROH2A2	1,6779	1,38E-06	SS18L1	1,1575	4,92E-02	LINC01224	-1,4390	1,79E-02
DDAH1	1,6737	1,17E-10	VPS54	1,1575	4,51E-02	BFSP1	-1,4391	7,88E-05
STC2	1,6675	7,19E-24	ATAD1	1,1574	2,31E-02	LPAR2	-1,4391	1,43E-02
TNFAIP8	1,6662	2,86E-06	SLC35A4	1,1570	2,78E-02	EGR3	-1,4392	2,86E-10
RGS2	1,6652	3,71E-08	DHX37	1,1566	3,30E-02	HCFC1R1	-1,4392	1,96E-05
NOS1AP	1,6638	3,31E-02	ZFP62	1,1564	4,96E-02	RELL1	-1,4399	6,09E-05
ABCC3	1,6625	1,44E-09	ITGB4	1,1561	3,50E-02	CCDC40	-1,4413	2,76E-02

SERPINF1	1,6606	1,63E-08	TCERG1	1,1555	2,70E-02	FAM83D	-1,4427	4,10E-05
LHX4	1,6603	2,88E-06	ENTR1	1,1553	2,85E-02	GBGT1	-1,4437	1,44E-02
SGK3	1,6573	1,78E-03	TMEM268	1,1553	3,92E-02	FOSB	-1,4438	2,18E-04
H4C14	1,6551	2,51E-09	DPM2	1,1549	3,15E-02	CCL2	-1,4462	9,44E-04
SETBP1	1,6540	4,14E-02	SLAIN2	1,1545	3,54E-02	SULT1B1	-1,4466	3,52E-04
ZNF860	1,6536	4,53E-05	CDC42BPB	1,1544	3,36E-02	BCL6	-1,4468	6,42E-10
KCNH1	1,6528	2,30E-07	XPO5	1,1544	2,98E-02	TRIM62	-1,4469	1,36E-04
BDNF	1,6522	2,44E-07	FOXK2	1,1543	2,92E-02	PDGFRB	-1,4481	2,44E-03
H2BC5	1,6510	1,08E-04	IARS1	1,1541	1,99E-02	AIM2	-1,4483	4,86E-03
GAS6	1,6493	2,22E-05	ORAI2	1,1540	3,08E-02	CDH19	-1,4484	3,96E-12
FUT9	1,6438	3,62E-02	BRIX1	1,1539	2,73E-02	CDKN2C	-1,4490	4,04E-05
RIPOR2	1,6279	4,21E-02	MED4	1,1536	4,85E-02	NREP	-1,4493	1,45E-10
AHNAK2	1,6275	4,47E-10	TBRG1	1,1535	3,40E-02	CADM1	-1,4506	1,12E-11
LURAP1L	1,6227	6,49E-04	SLC25A32	1,1532	3,29E-02	NRN1	-1,4508	1,61E-11
C6orf141	1,6221	7,23E-05	USP10	1,1531	2,98E-02	SHROOM2	-1,4517	1,86E-11
BICC1	1,6199	1,29E-03	CLEC16A	1,1531	4,78E-02	ADAMTS15	-1,4519	5,31E-05
SYTL4	1,6186	3,07E-02	CHAC1	1,1528	3,71E-02	ABHD17C	-1,4528	4,62E-13
BORCS8-MEF2B	1,6145	9,87E-03	METTL3	1,1528	3,96E-02	SOCS2-AS1	-1,4534	4,78E-03
IRS1	1,6122	7,10E-08	NIFK	1,1527	3,47E-02	PPFIA4	-1,4542	1,01E-04
ZC3HAV1L	1,6109	4,69E-02	PYCR1	1,1526	2,90E-02	RALGPS2	-1,4548	5,39E-06
OSBPL10	1,6101	6,39E-19	RPS6KB1	1,1526	3,76E-02	MAGED2	-1,4555	1,37E-12
H2AC6	1,6081	1,63E-08	MCM2	1,1521	2,54E-02	TUBB4A	-1,4573	3,62E-04
MACROD2	1,6071	1,16E-02	XPO6	1,1517	2,88E-02	DBNDD1	-1,4577	5,65E-05
MGAT4C	1,6071	1,48E-02	NELFCD	1,1512	3,25E-02	TMEM254	-1,4598	6,79E-05
AKNA	1,6066	1,05E-06	IPO9	1,1512	2,65E-02	SHISA4	-1,4615	4,43E-05
PLAGL1	1,6049	1,24E-02	CUL7	1,1510	4,09E-02	SUCLG2	-1,4620	3,17E-12
ZIC2	1,5956	4,81E-05	TBC1D14	1,1509	3,51E-02	MYH14	-1,4635	6,38E-05
AL139300.1	1,5955	3,18E-03	ZNF496	1,1508	3,97E-02	LINC01363	-1,4649	6,57E-04
GRIP1	1,5905	5,14E-03	TGS1	1,1506	3,97E-02	WNK4	-1,4649	2,39E-12
VIPR1	1,5899	7,25E-07	TUBGCP3	1,1505	3,76E-02	SLAMF9	-1,4651	2,56E-02
SLCO4C1	1,5884	3,91E-02	ABL1	1,1504	3,85E-02	CCNB2	-1,4688	3,43E-11
DLX2	1,5799	5,32E-06	SKI	1,1499	3,58E-02	TIAM2	-1,4700	1,39E-04
FGFRL1	1,5794	1,02E-08	SLC5A6	1,1498	4,18E-02	PDE3A	-1,4703	2,59E-04
PWWP2B	1,5775	2,40E-02	KIAA0319L	1,1496	3,76E-02	ZNF600	-1,4705	8,85E-03
TES	1,5773	4,63E-17	WDR36	1,1495	3,71E-02	CILP2	-1,4709	1,62E-02
PLXND1	1,5754	1,60E-17	GEMIN4	1,1489	4,80E-02	CEBPD	-1,4715	3,43E-02
ANKRD18B	1,5747	9,15E-04	SLBP	1,1489	3,60E-02	EFNB3	-1,4715	1,63E-04
IL17RD	1,5666	4,78E-02	PAQR4	1,1489	4,16E-02	VGLL3	-1,4716	2,92E-03
AC087632.2	1,5657	1,22E-02	TXLNG	1,1487	4,07E-02	COL7A1	-1,4744	2,28E-11
SHB	1,5634	2,38E-06	CRIM1	1,1484	3,00E-02	LINC01029	-1,4751	4,68E-13
PTHLH	1,5618	4,26E-03	STIM2	1,1483	4,32E-02	ACSF2	-1,4759	2,17E-03
TXNIP	1,5610	1,17E-08	PIP5K1A	1,1482	3,14E-02	ZNF671	-1,4770	5,68E-03
ADGRL4	1,5566	1,71E-04	PCSK7	1,1476	4,93E-02	TEN1-CDK3	-1,4778	1,04E-02
MCC	1,5559	1,62E-04	ZMYND11	1,1470	4,83E-02	MMP2	-1,4781	6,06E-14
GALNT13	1,5548	5,68E-03	RRP15	1,1468	4,51E-02	SDCBP2-AS1	-1,4786	4,75E-03
C1orf226	1,5541	1,09E-05	SMARCA4	1,1466	3,23E-02	HBP1	-1,4812	5,50E-06
LHFPL6	1,5535	4,46E-06	MAP1LC3B	1,1466	3,23E-02	PLA2G4A	-1,4816	4,45E-04
NUP210	1,5527	7,84E-16	ITPRIPL2	1,1462	4,28E-02	TLE2	-1,4827	5,54E-03
FZD5	1,5464	2,17E-04	SURF6	1,1461	4,54E-02	TP53INP2	-1,4840	3,76E-05

NECTIN4	1,5441	2,89E-02	NUS1	1,1460	4,19E-02	CENPE	-1,4850	9,74E-06
BEND4	1,5438	7,77E-03	TEX10	1,1459	4,42E-02	ROBO1	-1,4852	7,44E-13
ZBTB46	1,5426	1,82E-02	TNPO2	1,1456	3,74E-02	PLTP	-1,4872	1,10E-06
CRYBG1	1,5386	7,38E-07	NOP14	1,1455	3,76E-02	PLCB1	-1,4874	5,00E-05
CTSZ	1,5377	1,58E-17	IPO5	1,1451	3,29E-02	SIPA1L2	-1,4897	6,80E-14
ATP6V0A4	1,5353	9,43E-06	ISG20L2	1,1449	3,95E-02	ERFE	-1,4900	6,81E-04
DNAAF4	1,5289	3,10E-03	CUL4A	1,1447	3,72E-02	UBE2C	-1,4907	1,39E-12
EFNB2	1,5252	1,04E-06	RPF2	1,1438	4,47E-02	PAX8-AS1	-1,4922	2,92E-05
NCR3LG1	1,5243	2,92E-03	EIF3J	1,1435	3,96E-02	PAPSS2	-1,4929	1,35E-14
SEMA3C	1,5236	1,40E-07	KIAA0100	1,1433	3,86E-02	AL161431.1	-1,4943	2,96E-13
C4A	1,5235	4,27E-02	FRMD8	1,1431	4,48E-02	GBP2	-1,4960	2,78E-06
GLB1L2	1,5233	4,55E-06	GAK	1,1428	4,94E-02	ARHGAP5-AS1	-1,4963	9,61E-05
FERMT1	1,5207	1,75E-13	NAA15	1,1426	4,56E-02	NTN1	-1,4970	2,42E-03
TNFRSF10A	1,5190	5,38E-06	POGK	1,1419	4,46E-02	MLPH	-1,4971	3,26E-04
COL4A5	1,5188	4,50E-06	LRP8	1,1419	4,20E-02	HLA-E	-1,4976	1,86E-13
ST8SIA4	1,5156	5,65E-05	HACD3	1,1416	4,56E-02	ITGB8	-1,4978	6,36E-16
PLD6	1,5134	4,82E-05	SF3B1	1,1416	3,96E-02	ANKH	-1,4980	8,35E-16
CLMP	1,5075	4,30E-13	UPF1	1,1414	4,18E-02	AC011511.4	-1,4984	1,25E-02
ADAM19	1,5062	1,75E-06	DYNC1LI2	1,1406	4,40E-02	ATP10A	-1,4989	8,14E-05
NEFL	1,5060	1,10E-05	PARP4	1,1400	4,69E-02	RNASEL	-1,4989	2,18E-05
SLAMF7	1,5032	1,79E-02	CD55	1,1382	4,99E-02	PIF1	-1,4991	1,90E-03
NHS	1,5002	3,56E-05	PDCD11	1,1365	4,94E-02	LAMA1	-1,4992	1,13E-04
TESC	1,4981	2,18E-04	SOX21-AS1	9,4672	1,79E-02	TRO	-1,4996	8,92E-05
SPIRE2	1,4951	2,13E-04	AC021613.1	4,8652	4,86E-02	PTGS1	-1,5002	4,30E-03
GLIS2	1,4941	1,06E-05	LINC01537	4,4637	3,69E-05	PCDHGB5	-1,5018	5,61E-03
ABCA3	1,4938	1,83E-04	FP671120.4	4,2831	1,98E-05	KLF9	-1,5025	4,66E-16
DGKH	1,4934	1,86E-05	CACNA2D1-AS1	4,0921	4,82E-03	THBS1	-1,5030	2,28E-07
SORCS2	1,4898	1,02E-02	FP236241.1	3,8517	9,43E-03	ZEB2	-1,5070	6,14E-07
HS6ST2	1,4898	2,26E-05	AP000439.2	2,8840	2,23E-02	SCG5	-1,5087	1,60E-02
IL12A	1,4889	1,55E-02	GAS6-DT	2,5274	3,00E-02	LOXL4	-1,5093	1,71E-07
XAGE1B	1,4887	2,01E-04	EDNRB-AS1	2,3732	4,42E-02	SLC5A3	-1,5093	1,76E-07
NLN	1,4882	3,74E-05	AC016831.1	2,2368	9,66E-05	SOCS2	-1,5112	5,14E-06
LEF1	1,4875	6,19E-06	SH3RF3-AS1	2,2162	1,97E-02	HLA-B	-1,5132	1,91E-07
DAPK1	1,4845	9,99E-03	CHRM3-AS2	2,0829	2,97E-03	DUSP16	-1,5144	2,54E-03
METRNL	1,4801	1,19E-05	DIRC3-AS1	2,0588	2,32E-14	LSAMP	-1,5150	2,89E-06
CSF1	1,4792	1,05E-04	AL162377.1	1,9433	2,82E-02	MCAM	-1,5153	5,73E-17
HOXD13	1,4759	1,25E-03	AL359636.2	1,9201	4,67E-02	RAB3B	-1,5157	4,14E-02
CLGN	1,4741	2,16E-02	MIR31HG	1,8997	2,62E-09	UGT8	-1,5184	3,80E-06
E2F7	1,4735	2,78E-06	LINC01670	1,7989	1,52E-02	AC015813.1	-1,5194	2,94E-05
EIF5A2	1,4729	1,44E-04	LINC01819	1,6317	5,83E-06	GNG2	-1,5197	1,75E-06
MISP	1,4726	9,49E-05	AC006058.1	1,5225	1,87E-03	TRPV4	-1,5199	2,66E-06
WDFY2	1,4693	1,34E-05	GRASLND	1,4952	4,27E-02	MTMR11	-1,5201	1,04E-03
VGF	1,4690	1,53E-06	LINP1	1,4940	9,38E-03	ARMCX4	-1,5203	1,55E-03
SPTBN2	1,4661	3,18E-12	AC016831.6	1,4884	3,21E-03	FXYD6	-1,5207	1,74E-04
GREB1L	1,4632	1,78E-02	AL590617.2	1,4741	4,24E-13	FAXDC2	-1,5208	4,76E-04
B4GALNT1	1,4621	1,76E-05	MIR29B2CHG	1,4391	2,25E-02	TBCE_2	-1,5210	4,87E-05
CYP1A1	1,4588	1,03E-04	MIR17HG	1,4264	1,70E-04	CTAG1B	-1,5217	3,69E-03
SLC25A15	1,4585	2,51E-11	AC008875.3	1,4181	4,09E-03	ADAM11	-1,5247	2,08E-03
NPTXR	1,4581	7,76E-04	AC104958.2	1,4064	4,06E-07	DKK3	-1,5248	3,18E-03

HIC2	1,4550	5,71E-04	MIRLET7BHG	1,4051	5,34E-04	BCAS4	-1,5250	3,18E-03
TNFRSF21	1,4539	4,86E-13	ZEB1-AS1	1,4032	2,41E-02	TAMALIN	-1,5253	1,12E-02
NR2F1	1,4530	6,67E-04	GAS6-AS1	1,3958	2,22E-03	SHTN1	-1,5274	7,74E-06
LRRC8B	1,4526	2,04E-02	VPS9D1-AS1	1,3901	3,12E-02	NDRG1	-1,5276	3,32E-17
ODC1	1,4519	1,08E-11	AL590666.2	1,3637	2,70E-02	JUN	-1,5287	8,12E-07
PDF	1,4513	1,31E-04	PCCA-DT	1,3627	4,11E-02	AC007566.1	-1,5288	1,56E-04
UCHL3	1,4493	1,32E-04	AC114930.1	1,3600	4,36E-03	GRK5	-1,5288	7,48E-14
CPVL	1,4482	2,82E-04	AC004943.2	1,3599	4,56E-02	KCNC4	-1,5302	2,00E-04
AADAT	1,4474	8,84E-05	LINC00460	1,3504	3,22E-02	AL157935.2	-1,5311	4,23E-02
CCN2	1,4467	3,44E-11	AL162595.1	1,3501	1,76E-03	LINC01579	-1,5323	2,58E-05
SH3BGRL2	1,4441	7,43E-03	MIR22HG	1,3440	2,94E-06	CSAG2	-1,5351	1,35E-02
GCH1	1,4433	9,74E-03	NR2F1-AS1	1,3214	2,25E-02	PDLIM2	-1,5379	3,28E-06
THSD4	1,4425	2,19E-05	AC090114.2	1,3132	2,48E-02	ADGRE1	-1,5380	6,67E-04
FOXC2	1,4387	4,22E-08	AC016588.2	1,3119	4,63E-02	HPS5	-1,5412	5,41E-16
SLC22A15	1,4376	3,42E-04	FBXL19-AS1	1,2978	2,61E-02	TENM1	-1,5437	7,50E-06
MEIS2	1,4371	3,02E-04	AC010618.3	1,2834	4,03E-02	JUP	-1,5455	3,63E-03
LRCH1	1,4359	7,07E-05	AC079781.5	1,2700	3,16E-02	LINC00622	-1,5491	4,96E-04
PLCB4	1,4357	9,14E-04	EMSLR	1,2675	4,86E-02	SLC16A6	-1,5494	7,98E-06
SIGMAR1	1,4344	1,58E-11	DLEU1	1,2635	4,01E-02	OPRD1	-1,5505	2,54E-05
P2RX5	1,4324	8,17E-03	COX10-AS1	1,2445	2,91E-02	LINC00565	-1,5505	4,83E-05
GEM	1,4307	6,93E-04	NIPBL-DT	1,2344	8,72E-04	GRIK2	-1,5525	1,88E-06
NETO2	1,4295	8,17E-11	MIRLET7A1H G	1,2128	1,12E-02	CHRDL1	-1,5555	1,14E-16
SLC7A2	1,4283	3,59E-04	HCG18	1,1926	9,79E-03	BTN3A1	-1,5566	4,52E-03
IGF2BP3	1,4252	8,45E-11	CRNDE	1,1924	6,59E-03	IRF5	-1,5590	4,72E-02
ADGRF1	1,4249	2,02E-10	LINC01239	1,1649	3,78E-02	GCNA	-1,5603	3,69E-02
IFITM1	1,4240	3,88E-02	LINC00511	1,1604	2,63E-02	EXTL1	-1,5605	1,83E-07
PAPPA	1,4233	1,76E-04	SPARC	-1,1346	4,81E-02	TRPV1	-1,5620	2,62E-06
TRIM36	1,4228	3,14E-04	SLC20A1	-1,1383	4,13E-02	GSTA4	-1,5625	1,48E-05
TSC22D1	1,4194	1,69E-11	HSBP1	-1,1393	4,64E-02	MAGED1	-1,5658	1,43E-17
SLC47A1	1,4192	1,89E-02	APP	-1,1393	4,04E-02	CDK18	-1,5662	1,00E-05
MAPK11	1,4172	2,18E-02	CALR	-1,1409	3,68E-02	AURKA	-1,5729	6,35E-16
GNAS	1,4169	3,27E-12	DAZAP2	-1,1410	4,27E-02	PLK1	-1,5731	3,68E-16
BIVM	1,4166	6,24E-10	FRMD4A	-1,1429	4,75E-02	MT2A	-1,5745	1,38E-08
PDE4D	1,4161	5,47E-05	QSOX1	-1,1438	4,12E-02	PRKG1	-1,5778	4,78E-02
SOHLH2	1,4156	1,60E-09	CD276	-1,1454	4,28E-02	PNRC1	-1,5796	5,85E-07
SLC35F1	1,4154	5,68E-04	ERCC1	-1,1454	3,45E-02	SYTL2	-1,5799	3,49E-07
SPOCK1	1,4149	6,90E-05	ARF4	-1,1454	3,26E-02	CD82	-1,5808	1,02E-04
DDR2	1,4144	2,24E-05	ELOVL5	-1,1458	3,92E-02	BNIP3	-1,5820	2,07E-20
PM20D2	1,4119	2,34E-04	CAB39	-1,1469	3,70E-02	AL162231.1	-1,5825	4,11E-02
ANKRD50	1,4117	3,63E-05	CHMP1B	-1,1472	4,99E-02	BMF	-1,5828	2,72E-06
KLHL23	1,4114	4,13E-04	NBR1	-1,1473	3,60E-02	CCNB1	-1,5837	1,17E-18
OPN3	1,4110	3,48E-02	ESYT2	-1,1474	3,47E-02	MGLL	-1,5853	2,13E-18
GALNT10	1,4062	1,20E-04	USF2	-1,1476	3,88E-02	NGFR	-1,5867	1,49E-07
METTL8	1,4058	3,47E-03	LEPROT	-1,1479	4,07E-02	GAGE12F	-1,5884	1,19E-02
SMAD1	1,4048	1,92E-03	ACSS2	-1,1481	3,79E-02	MGAM2	-1,5888	7,79E-04
PLCE1	1,4045	8,98E-04	UBE2E3	-1,1490	4,45E-02	CD68	-1,5908	3,59E-08
EML5	1,4036	2,18E-02	SYT11	-1,1491	4,78E-02	ADD3	-1,5917	1,13E-19
CENPV	1,4030	4,80E-02	TCAF1	-1,1493	4,11E-02	MRGPRX4	-1,5921	3,27E-06
ISG20	1,4029	4,44E-09	PIP4K2B	-1,1498	3,72E-02	LINC01588	-1,5922	3,25E-02

RUNX3	1,4025	1,35E-09	UXS1	-1,1498	4,42E-02	KLHL15	-1,5927	3,80E-08
SLC9B2	1,4013	5,36E-04	SVIL	-1,1499	3,35E-02	AC083843.2	-1,5937	1,88E-07
AMIGO2	1,4012	1,58E-10	ANP32E	-1,1499	3,77E-02	YPEL2	-1,5958	6,07E-06
TIPARP	1,4002	5,84E-11	ENO2	-1,1503	2,68E-02	SOX6	-1,5968	7,80E-08
SH3RF3	1,3998	7,98E-04	EMD	-1,1505	4,42E-02	INHBA	-1,5980	1,62E-20
ZFPM2	1,3996	7,01E-04	SPRED1	-1,1507	3,40E-02	DOK3	-1,6016	1,55E-02
PTGES	1,3986	1,07E-02	ALCAM	-1,1511	2,96E-02	CYP2E1	-1,6033	2,42E-03
FNDC3A	1,3960	6,92E-05	ANXA6	-1,1513	3,87E-02	TGM2	-1,6045	6,71E-21
ANGEL1	1,3944	1,43E-03	PPP2R5C	-1,1513	3,89E-02	AC013489.1	-1,6061	2,29E-03
COL6A1	1,3919	1,46E-10	MLF2	-1,1515	2,73E-02	SHROOM4	-1,6068	1,23E-08
PMAIP1	1,3919	5,16E-10	ZER1	-1,1516	4,67E-02	ARNT2	-1,6086	6,75E-19
CDCA7	1,3914	2,87E-09	DHCR24	-1,1519	2,30E-02	BTN2A2	-1,6086	1,07E-05
NOTCH1	1,3905	1,26E-04	MAP4K4	-1,1520	2,84E-02	PII5	-1,6088	1,49E-06
LYN	1,3900	1,24E-03	LAMP2	-1,1528	2,93E-02	ST6GALNAC3	-1,6108	1,33E-04
TSKU	1,3897	7,05E-04	SEC13	-1,1528	3,12E-02	AZGP1	-1,6129	4,21E-06
GTF3A	1,3896	2,22E-09	P3H1	-1,1528	4,27E-02	SHC4	-1,6163	6,11E-07
COL9A3	1,3894	6,93E-05	CDKN1B	-1,1531	3,83E-02	YPEL3	-1,6174	6,18E-04
NBEA	1,3873	9,75E-04	EID1	-1,1531	2,31E-02	LINC01419	-1,6195	2,18E-04
JADE3	1,3871	1,83E-03	SOX10	-1,1535	2,04E-02	ABCA6	-1,6197	1,81E-03
GJA3	1,3868	6,53E-03	KLHL21	-1,1535	2,28E-02	RBMS3-AS3	-1,6202	3,75E-02
CTDSPL	1,3856	5,85E-04	PAIP2	-1,1536	3,29E-02	MSC-AS1	-1,6259	6,77E-04
FGFR3	1,3851	3,15E-02	ALDH7A1	-1,1539	3,44E-02	NR4A1	-1,6269	4,26E-10
ABCB9	1,3840	4,13E-04	EIF3H	-1,1540	2,09E-02	CLDN1	-1,6284	9,67E-16
CCN3	1,3838	3,39E-03	IGFBP4	-1,1542	3,02E-02	SGK1	-1,6308	1,73E-20
KLF5	1,3833	4,47E-10	KIF23	-1,1547	3,20E-02	TRIM22	-1,6315	2,59E-02
ABCC4	1,3830	3,15E-04	PXDC1	-1,1551	4,13E-02	NAP1L3	-1,6319	1,12E-04
ZCCHC2	1,3821	1,36E-03	P4HA2	-1,1551	4,11E-02	SLC24A2	-1,6322	2,34E-03
LARP6	1,3798	8,65E-08	SHMT2	-1,1552	1,95E-02	CCDC80	-1,6335	7,50E-04
NAT8L	1,3782	1,82E-03	KAT2B	-1,1552	4,90E-02	IL31RA	-1,6373	1,12E-02
ARHGAP23	1,3779	5,50E-09	PABPC1	-1,1555	1,74E-02	ZNF471	-1,6383	8,27E-05
KIAA1958	1,3757	7,12E-03	WBP1	-1,1556	3,80E-02	PAFAH1B2	-1,6387	8,31E-22
PROSER1	1,3756	8,44E-09	UBA1	-1,1556	1,92E-02	MEF2C	-1,6401	3,86E-09
SYNGR1	1,3753	4,22E-03	WBP2	-1,1558	3,07E-02	SLC9A5	-1,6407	2,24E-06
SLC7A1	1,3735	1,34E-04	KRT80	-1,1559	2,53E-02	ADAMTS4	-1,6420	4,26E-02
BEND3	1,3730	6,80E-03	NEK7	-1,1564	2,84E-02	COL5A2	-1,6450	7,63E-23
DDX58	1,3718	3,08E-02	SLC6A8	-1,1571	2,69E-02	SOX13	-1,6451	3,25E-07
GADD45A	1,3713	1,68E-08	SNRPN	-1,1579	2,91E-02	ROBO4	-1,6464	2,34E-07
MYCBP2	1,3710	3,33E-04	NCAPD2	-1,1583	2,00E-02	PHF19	-1,6483	2,29E-23
IRAK1BP1	1,3710	4,67E-02	TUBA1B	-1,1586	1,51E-02	SLC8A1	-1,6533	7,31E-04
SMOC1	1,3705	7,09E-04	TM4SF1	-1,1588	3,78E-02	LINC00702	-1,6639	2,71E-05
CDYL2	1,3694	1,20E-03	CASP4	-1,1593	4,83E-02	PLOD2	-1,6667	1,86E-23
STAMBPL1	1,3688	7,24E-04	NQO1	-1,1594	1,80E-02	WNT2B	-1,6681	6,04E-03
FN1	1,3683	1,56E-04	SPPL2A	-1,1594	2,37E-02	FST	-1,6694	1,53E-11
TLL11	1,3678	4,46E-02	PLP2	-1,1596	1,87E-02	CDRT1	-1,6727	3,12E-02
PPM1E	1,3671	8,40E-03	TMTC2	-1,1600	2,23E-02	GPR160	-1,6733	3,90E-02
PLK3	1,3658	7,38E-07	IFT80	-1,1610	2,80E-02	TMEM229B	-1,6738	2,73E-08
B3GNT5	1,3630	3,21E-03	PSMA2	-1,1612	2,33E-02	KIF20A	-1,6756	5,54E-10
LRIG3	1,3626	2,64E-07	WBP1L	-1,1616	3,36E-02	FOXD3-AS1	-1,6756	7,66E-06
CEP19	1,3625	4,59E-02	KDM5B	-1,1622	1,88E-02	GRM8	-1,6782	8,65E-03

DDX60L	1,3621	4,88E-02	ACTR10	-1,1629	3,64E-02	CXADR	-1,6813	1,19E-05
COL5A1	1,3601	8,49E-04	TAGLN2	-1,1629	1,33E-02	SCOC	-1,6847	2,01E-22
CAMKK2	1,3598	3,61E-07	SFT2D2	-1,1629	1,65E-02	EPHB1	-1,6861	6,25E-07
SGMS2	1,3579	3,75E-03	TMEM30A	-1,1630	1,51E-02	TENT5A	-1,6865	1,93E-20
TRIM14	1,3576	1,31E-03	RAP1GDS1	-1,1631	2,93E-02	CIITA	-1,6866	4,09E-11
WASF3	1,3564	1,58E-03	GUSB	-1,1633	2,73E-02	ZDHC11	-1,6874	2,19E-09
KBTBD8	1,3556	4,26E-02	FYN	-1,1643	2,71E-02	ZNF425	-1,6909	4,40E-04
ARAP2	1,3554	3,69E-03	VASP	-1,1644	2,33E-02	BAMBI	-1,6920	6,79E-11
PLCL2	1,3551	1,46E-02	EIF3E	-1,1646	1,16E-02	NID2	-1,6929	4,65E-02
FAM241A	1,3549	6,51E-07	SLC37A2	-1,1648	3,76E-02	AP003071.5	-1,6945	3,54E-02
GLI2	1,3549	2,57E-03	LAPTM4A	-1,1656	1,65E-02	ARHGAP31	-1,6956	1,46E-08
LAMA5	1,3546	3,16E-04	SOD1	-1,1657	2,14E-02	LINC02476	-1,6974	2,69E-02
TBC1D19	1,3523	2,92E-02	ALAD	-1,1658	3,18E-02	CDC25C	-1,6981	5,23E-05
MEX3D	1,3522	1,12E-02	LITAF	-1,1659	1,89E-02	C15orf54	-1,6995	2,06E-02
IGF2BP1	1,3522	5,18E-04	ZDHC3	-1,1659	2,69E-02	TCAF2	-1,7019	7,51E-09
AC107871.1	1,3502	1,05E-02	EMC7	-1,1664	1,94E-02	SORBS1	-1,7033	2,58E-10
EEF2KMT	1,3499	1,98E-03	PSMB2	-1,1665	1,46E-02	CYB5R2	-1,7045	1,67E-08
RNASEH2B	1,3490	1,36E-03	YWHAQ	-1,1669	1,11E-02	DNAH11	-1,7050	1,26E-02
MARK1	1,3486	6,14E-03	DNTTIP1	-1,1670	2,55E-02	ZNF626	-1,7066	3,67E-03
STC1	1,3486	2,16E-03	ATP5PO	-1,1673	1,79E-02	AC068580.4	-1,7067	7,26E-08
PLEKHG3	1,3477	2,47E-02	SASH1	-1,1691	2,55E-02	ITIH5	-1,7087	1,56E-24
TOR4A	1,3474	2,99E-03	TRAM1	-1,1692	1,12E-02	ARHGAP24	-1,7110	2,67E-02
NIPAL2	1,3473	2,56E-03	TMED9	-1,1692	1,41E-02	COX7B2	-1,7111	3,73E-02
PI4K2B	1,3470	1,51E-03	TLE4	-1,1693	1,34E-02	NFATC2	-1,7138	1,21E-12
FASN	1,3468	4,18E-04	GOLT1B	-1,1694	1,46E-02	NANOS1	-1,7222	6,94E-08
GPR157	1,3467	1,27E-02	ZFAND6	-1,1695	2,03E-02	ADAMTSL1	-1,7238	4,40E-06
ANO8	1,3466	4,70E-03	CAV1	-1,1695	1,16E-02	KCND1	-1,7270	2,37E-02
ZNF697	1,3462	4,16E-07	PARN	-1,1695	1,77E-02	SCARA3	-1,7327	4,14E-02
ACACA	1,3448	5,85E-04	CLSTN1	-1,1697	1,05E-02	ST6GALNAC5	-1,7332	2,33E-02
WWC1	1,3444	1,55E-02	CTSA	-1,1703	1,46E-02	CSRP2	-1,7334	2,89E-25
PROS1	1,3442	5,14E-06	AASS	-1,1707	2,28E-02	SLIT2	-1,7338	2,65E-11
TSEN54	1,3437	4,35E-03	MFF	-1,1709	2,00E-02	PRSS12	-1,7366	8,58E-10
KLF10	1,3430	1,24E-07	CNOT7	-1,1714	1,56E-02	ZNF208	-1,7383	4,40E-02
TIMM23B-AGAP6	1,3420	9,89E-03	IDI1	-1,1717	1,49E-02	TAGLN3	-1,7400	4,76E-03
DICER1	1,3407	9,64E-04	ZC3H4	-1,1719	2,05E-02	UNC13D	-1,7437	4,51E-03
DDHD1	1,3406	2,75E-03	UBE2Q2	-1,1724	2,15E-02	MDGA1	-1,7458	1,26E-02
SPOCD1	1,3397	8,40E-03	BTBD3	-1,1729	1,12E-02	FAM117A	-1,7479	1,42E-02
CASKIN2	1,3385	5,46E-03	CLIP4	-1,1732	1,03E-02	LINC02582	-1,7516	5,77E-05
GAREM2	1,3373	1,54E-02	PLXNB1	-1,1733	2,17E-02	KRT9	-1,7544	1,05E-02
MYO10	1,3370	8,65E-03	CNPY2	-1,1733	1,46E-02	HMGCR	-1,7556	1,01E-29
GLYCTK	1,3361	1,35E-02	ZNF274	-1,1733	2,11E-02	VCX3B	-1,7565	4,84E-10
DHCR7	1,3356	1,09E-07	FXR1	-1,1734	1,13E-02	AL355482.1	-1,7621	3,17E-02
H4C15	1,3355	2,65E-03	ARHGEF40	-1,1735	1,56E-02	TNFSF14	-1,7632	1,74E-02
SESN2	1,3334	1,03E-07	ZNF548	-1,1735	2,66E-02	SERPINA5	-1,7715	5,00E-07
KLF4	1,3329	4,21E-07	BACE2	-1,1739	1,15E-02	TSPAN13	-1,7728	6,73E-29
FBXO45	1,3319	1,65E-06	GDNF	-1,1743	1,48E-02	CAPN3	-1,7729	4,27E-02
EPHA4	1,3301	3,04E-03	TSPAN14	-1,1744	9,87E-03	AC005833.1	-1,7744	9,22E-04
PITPNM1	1,3300	2,54E-03	PTTG1IP	-1,1748	8,19E-03	TRPM3	-1,7756	1,21E-03
MEX3A	1,3266	6,72E-03	SRC	-1,1751	1,80E-02	HDAC9	-1,7780	1,09E-24

RNF144A	1,3263	2,38E-03	ME1	-1,1753	2,63E-02	EIF4EBP3	-1,7822	2,96E-02
RCBTB1	1,3258	6,77E-06	GPAT3	-1,1755	8,61E-03	PRSS23	-1,7839	1,46E-32
SLFN11	1,3257	2,24E-03	ATG9A	-1,1763	1,75E-02	ITGA7	-1,7840	3,36E-12
E2F2	1,3255	6,91E-03	SND1	-1,1769	6,45E-03	CPN1	-1,7851	3,10E-07
PPAT	1,3251	7,14E-07	KIF22	-1,1770	1,36E-02	ASTN1	-1,7866	3,27E-07
FAM210B	1,3251	2,21E-07	BRWD3	-1,1773	1,72E-02	PEX5L	-1,7888	1,95E-02
PCGF5	1,3250	3,03E-06	AHRR	-1,1778	9,79E-03	AC093787.2	-1,7890	3,80E-08
SLC35F2	1,3244	3,99E-05	NSA2	-1,1787	7,78E-03	ZNF528	-1,7892	2,00E-09
GTPBP1	1,3234	5,84E-06	VAMP7	-1,1789	1,15E-02	ANKRD37	-1,7898	2,71E-05
PRELID3B	1,3228	1,53E-07	TUBB	-1,1791	4,81E-03	WIPI1	-1,7928	1,69E-11
STK40	1,3223	4,83E-07	MKNK1	-1,1796	3,18E-02	CHL1	-1,7935	1,57E-02
WWC2	1,3220	2,14E-03	SGCB	-1,1797	1,39E-02	SRRM5	-1,8045	3,23E-02
IRX3	1,3210	4,61E-02	CARHSP1	-1,1798	1,18E-02	AC092821.3	-1,8060	2,26E-14
ETFDH	1,3209	7,51E-03	OTUD5	-1,1799	9,79E-03	IFIT2	-1,8169	4,54E-03
RPP40	1,3203	1,67E-02	SARAF	-1,1805	8,17E-03	SLC44A1	-1,8205	1,45E-31
ARSJ	1,3199	5,84E-03	LBR	-1,1807	1,16E-02	DTX1	-1,8210	5,95E-06
H1-2	1,3196	1,41E-02	RUNX1	-1,1809	5,89E-03	MYO7A	-1,8223	5,23E-03
B3GLCT	1,3184	8,70E-03	ATP6VIC1	-1,1810	9,54E-03	PTN	-1,8264	1,81E-06
CEP126	1,3184	3,89E-02	PLK2	-1,1815	4,82E-03	GAS7	-1,8264	1,46E-32
CLN6	1,3183	4,16E-06	TPP1	-1,1816	7,64E-03	MIR503HG	-1,8274	3,24E-06
GRAMD1B	1,3178	2,66E-06	SNX24	-1,1824	1,55E-02	CRMP1	-1,8303	4,72E-06
AHR	1,3177	1,65E-03	HEXIM1	-1,1834	7,33E-03	RBMS3	-1,8303	5,77E-10
OBI1	1,3169	3,32E-03	BUB1B	-1,1837	1,21E-02	NUDT13	-1,8358	7,50E-03
RAI14	1,3167	2,37E-03	SEMA7A	-1,1837	1,37E-02	COL16A1	-1,8360	5,12E-15
TLN2	1,3156	3,72E-02	RNF130	-1,1843	9,63E-03	COL15A1	-1,8404	4,00E-06
AIF1L	1,3147	4,72E-06	TMEM263	-1,1846	8,24E-03	AC073896.1	-1,8466	2,84E-03
ARHGAP10	1,3142	1,11E-02	TNS3	-1,1851	9,23E-03	CCNG2	-1,8491	2,56E-10
CHRNA5	1,3142	2,61E-02	P4HB	-1,1853	3,69E-03	TUBA1A	-1,8510	2,47E-33
KLF16	1,3137	1,57E-02	APIM1	-1,1853	6,05E-03	ANO1	-1,8543	3,03E-31
BAHCC1	1,3134	1,26E-02	NDRG3	-1,1857	1,76E-02	SPON2	-1,8556	1,20E-06
SETDB2	1,3131	2,02E-02	ERLEC1	-1,1857	6,54E-03	ST8SIA5	-1,8558	1,06E-05
JUNB	1,3127	2,45E-03	BBS2	-1,1858	1,79E-02	HEY2	-1,8569	6,81E-03
UCK2	1,3120	1,17E-06	ESPL1	-1,1866	1,75E-02	ITIH4	-1,8620	2,65E-02
MDN1	1,3120	2,73E-03	MORF4L2	-1,1867	3,96E-03	MT1X	-1,8620	6,09E-06
SLC19A1	1,3114	7,12E-03	P4HA1	-1,1868	5,10E-03	RGS8	-1,8625	3,45E-02
MVD	1,3104	6,48E-03	PTPA	-1,1871	4,96E-03	KLF2	-1,8643	3,52E-10
BCL2L11	1,3103	1,40E-02	FAM200B	-1,1874	7,69E-03	ARHGEF37	-1,8643	7,18E-11
FKBP5	1,3082	3,48E-05	BTG1	-1,1877	3,38E-03	AC008074.2	-1,8720	1,13E-02
TELO2	1,3079	5,49E-03	EHD4	-1,1885	3,85E-03	IL1B	-1,8761	1,62E-10
PCDHB15	1,3077	2,40E-02	ANKRD28	-1,1894	3,93E-03	SESN3	-1,8786	2,07E-08
PVR	1,3072	2,71E-03	COPG1	-1,1896	3,59E-03	AL669918.1	-1,8802	4,85E-02
PGAP4	1,3049	1,68E-02	LTA4H	-1,1900	4,57E-03	PLEKHG1	-1,8851	4,28E-05
CDC42EP1	1,3048	5,13E-03	PJA2	-1,1918	4,40E-03	LINC02616	-1,8931	1,46E-02
ADGRL2	1,3046	9,57E-03	NFIB	-1,1925	7,22E-03	KCNN3	-1,8941	4,66E-15
AEN	1,3043	1,47E-06	CCNDBP1	-1,1929	7,45E-03	GPX3	-1,8981	9,24E-03
KCNJ2	1,3038	3,26E-02	OTUD7B	-1,1931	4,89E-03	S100B	-1,9039	1,13E-11
NTAQ1	1,3036	1,25E-02	DARS1	-1,1933	4,04E-03	BCL2A1	-1,9120	4,35E-03
PIGW	1,3034	9,89E-06	SLC12A2	-1,1944	5,49E-03	AL162231.4	-1,9141	1,40E-02
PCDHGA10	1,3034	9,54E-03	MPI	-1,1950	5,17E-03	STON1	-1,9175	3,16E-06

VPS13A	1,3027	2,09E-02	DSTN	-1,1954	2,00E-03	CT45A6	-1,9180	4,41E-02
PLEKHO2	1,3024	6,62E-03	SLC12A7	-1,1955	6,28E-03	MPZ	-1,9195	1,44E-03
ARHGEF4	1,3024	3,05E-02	IFT46	-1,1958	1,07E-02	AL359921.2	-1,9203	5,42E-06
C6orf120	1,3023	7,12E-06	VMP1	-1,1963	1,99E-03	ZNF648	-1,9220	5,10E-03
C19orf25	1,3021	1,14E-02	CAMK2D	-1,1963	5,46E-03	UGT2B7	-1,9234	1,87E-02
KATNAL1	1,3021	8,67E-03	ITM2C	-1,1964	2,74E-03	SOD2	-1,9243	5,50E-37
CHAF1B	1,3018	9,20E-03	SUN2	-1,1967	4,61E-03	PCAT6	-1,9346	3,96E-05
ATP11A	1,3016	4,20E-03	ACVR1	-1,1971	1,63E-02	LRRK2	-1,9383	5,28E-04
TNFAIP2	1,3015	1,25E-02	SMAD3	-1,1972	4,31E-03	HMCN1	-1,9430	7,07E-19
GOLGA8B	1,3011	9,48E-03	SPATA20	-1,1975	7,36E-03	LINC01198	-1,9493	2,63E-11
USP43	1,3009	1,67E-02	OPTN	-1,1977	1,27E-02	AC080038.1	-1,9521	2,78E-03
SIMC1	1,3003	1,15E-02	KPNA2	-1,1982	2,26E-03	AL590004.3	-1,9527	2,54E-03
CHST11	1,2999	6,81E-03	REEP3	-1,1983	4,61E-03	AL139383.1	-1,9535	1,68E-09
URB1	1,2999	4,16E-03	RCAN1	-1,1985	1,59E-03	AC017116.1	-1,9660	4,09E-03
FGFBP1	1,2993	3,56E-02	SLC44A2	-1,1987	4,33E-03	SPOCK3	-1,9666	4,21E-02
IPMK	1,2991	4,45E-02	DPYSL2	-1,1995	3,89E-03	SULF1	-1,9682	6,61E-12
ANKS6	1,2988	2,54E-05	RACGAP1	-1,1999	3,66E-03	PDZD2	-1,9728	1,32E-08
GPALPP1	1,2987	6,48E-03	CXorf56	-1,2000	8,89E-03	HAPLN3	-1,9734	1,75E-11
JAZF1	1,2980	2,49E-02	IRGQ	-1,2001	8,09E-03	L3MBTL4	-1,9849	9,33E-04
CTPS1	1,2975	1,75E-06	DUSP14	-1,2002	4,40E-03	TPH1	-1,9852	1,04E-04
ANK2	1,2969	3,43E-02	PARP14	-1,2005	6,64E-03	LINC01341	-1,9993	7,85E-03
PER1	1,2966	1,92E-02	WIPI2	-1,2005	3,22E-03	PPT2-EGFL8	-2,0063	7,12E-03
FAM107B	1,2964	8,87E-06	MAN2A2	-1,2007	2,90E-03	SLC9A3-AS1	-2,0067	1,21E-03
MAP3K21	1,2963	2,37E-02	EPB41L2	-1,2014	2,38E-03	ABCA8	-2,0139	3,75E-02
XPO4	1,2954	9,17E-06	EIF3F	-1,2017	1,82E-03	RNASEK-C17orf49	-2,0145	3,85E-02
METTL15	1,2947	1,83E-02	FXYD5	-1,2023	1,71E-03	TAFA2	-2,0174	1,86E-16
DTL	1,2941	2,78E-06	C5orf15	-1,2032	1,98E-03	ARPP21	-2,0223	1,02E-08
CCDC9	1,2937	1,49E-02	WDR19	-1,2038	6,11E-03	TMEM132D-AS1	-2,0224	4,98E-08
RPL22L1	1,2936	5,05E-06	ERBB3	-1,2056	9,95E-04	ABI3BP	-2,0244	5,10E-11
PTGFRN	1,2930	1,79E-05	PSMA7	-1,2061	1,38E-03	AC023824.1	-2,0323	1,47E-03
CCP110	1,2928	5,05E-03	SLC26A6	-1,2061	4,28E-03	SSUH2	-2,0402	3,09E-17
TRIB3	1,2916	3,72E-03	SRPX	-1,2063	2,11E-03	MIR210HG	-2,0451	2,29E-03
MCOLN3	1,2914	3,54E-02	UBE2F	-1,2104	3,18E-03	ZNF676	-2,0464	1,37E-02
STRIP2	1,2911	1,86E-02	PFKM	-1,2107	2,96E-03	SEMA3G	-2,0512	1,07E-02
B3GAT3	1,2911	6,54E-03	MAGEC2	-1,2107	1,25E-03	GRAMD1C	-2,0542	3,59E-02
ALDH1B1	1,2911	1,13E-04	BRD8	-1,2110	2,26E-03	DAAM2-AS1	-2,0596	1,21E-02
EVI5L	1,2909	2,02E-02	IKBIP	-1,2113	3,61E-03	THBS2	-2,0635	3,12E-14
KIAA1549	1,2908	6,22E-03	ATP6V0E1	-1,2115	2,97E-03	AL035541.1	-2,0653	7,11E-13
TEAD4	1,2905	8,28E-05	ADAM10	-1,2115	1,02E-03	EHF	-2,0654	1,34E-03
RB1	1,2903	4,76E-03	KIF18B	-1,2117	3,87E-03	TMEM98	-2,0678	4,86E-15
U2AF1L5	1,2899	7,78E-03	GSN	-1,2122	7,12E-04	LRRC15	-2,0747	5,61E-03
SPART	1,2895	1,38E-05	DBN1	-1,2130	1,96E-03	KRT79	-2,0784	1,58E-02
POLH	1,2892	1,06E-02	JARID2	-1,2132	1,79E-03	AOC2	-2,0796	1,88E-03
GPR180	1,2892	4,53E-05	SNHG4	-1,2137	1,38E-03	COL19A1	-2,0831	1,58E-46
MMS22L	1,2881	9,81E-03	PLAUR	-1,2143	2,02E-03	AC015712.6	-2,0842	9,77E-14
PHLDB1	1,2876	3,64E-06	GPR161	-1,2152	4,04E-03	PILRA	-2,0849	3,53E-02
CDCA7L	1,2870	1,78E-05	CRTAP	-1,2157	5,84E-04	AC092376.2	-2,0851	3,88E-02
ROCK2	1,2870	4,45E-03	TPX2	-1,2159	4,62E-02	ALPP	-2,0861	1,10E-03
NAA16	1,2863	1,53E-02	B2M	-1,2165	4,03E-02	MMP25	-2,0909	2,81E-03

TRAK1	1,2858	1,13E-02	HMG20B	-1,2170	4,70E-02	MYO1D	-2,0916	1,93E-16
PKD1	1,2851	5,71E-03	PSMB4	-1,2176	3,96E-02	C1orf116	-2,0921	2,12E-03
SLC43A1	1,2841	3,50E-02	FKBP10	-1,2178	4,83E-04	SEC23A	-2,0932	8,94E-42
RELT	1,2836	1,46E-02	SMARCA1	-1,2180	1,19E-03	MCTP1	-2,0957	8,72E-11
CEP83	1,2830	1,63E-02	CAPN5	-1,2181	2,85E-03	MSC	-2,1069	1,04E-15
KANK2	1,2830	9,47E-06	CD99	-1,2187	2,27E-03	FAM133A	-2,1143	3,03E-09
H2BC21	1,2824	1,12E-02	LMAN1	-1,2195	5,40E-04	DHRS3	-2,1147	1,37E-20
CBWD3	1,2821	2,34E-02	PAGE5	-1,2196	4,20E-02	LINC02367	-2,1160	1,35E-03
EXT1	1,2818	1,16E-05	DEPDC1B	-1,2196	6,25E-03	CILK1	-2,1162	8,04E-21
PRKACB	1,2812	8,09E-05	PDIA6	-1,2198	4,18E-04	APOE	-2,1273	2,74E-04
PLCD3	1,2797	8,37E-05	CD63	-1,2198	3,77E-02	KLK2	-2,1275	6,28E-03
GTF2H2	1,2797	1,13E-04	EIF4B	-1,2210	3,34E-04	MARCHF4	-2,1322	4,70E-02
MYL9	1,2792	2,49E-02	CCNG1	-1,2210	7,12E-04	ATP6V1C2	-2,1478	4,30E-03
SPRED3	1,2785	1,26E-02	PRAME	-1,2212	1,30E-03	FAM20C	-2,1479	6,84E-23
TMEM201	1,2782	1,05E-02	ANXA2	-1,2216	3,23E-04	ABCB4	-2,1487	7,37E-08
TMPRSS5	1,2768	3,63E-02	ARHGAP5	-1,2224	3,96E-02	HLA-DPA1	-2,1507	4,04E-24
ZFHX4	1,2768	3,38E-02	SPAG9	-1,2230	4,83E-04	GFRA1	-2,1547	1,13E-05
BAZ1A	1,2759	1,13E-02	BGN	-1,2235	1,15E-03	FBXL7	-2,1620	3,20E-05
ZFP69B	1,2757	2,12E-02	ADII	-1,2242	1,10E-03	ST8SIA1	-2,1652	2,23E-08
ZBTB7B	1,2749	1,69E-02	TOB1	-1,2244	3,68E-03	HLA-DMA	-2,1709	2,19E-20
BCL2	1,2744	4,18E-02	CCNY	-1,2246	7,37E-04	C1R	-2,1720	1,65E-20
TNFSF9	1,2739	2,01E-02	SLX1A	-1,2252	2,29E-03	HLA-DPB1	-2,1766	1,25E-21
ABCC10	1,2738	3,15E-02	VKORC1	-1,2252	3,97E-02	NRCAM	-2,1782	4,98E-19
URB2	1,2734	2,58E-05	RPS15A	-1,2253	3,14E-02	KRT81	-2,1830	3,03E-25
FUCA1	1,2732	3,40E-02	RASSF8-AS1	-1,2260	1,69E-03	TEX41	-2,1895	7,40E-07
FBXW8	1,2731	1,68E-02	RPS6KA3	-1,2263	3,11E-02	PTPRZ1	-2,1911	2,39E-20
KDM2B	1,2729	1,50E-02	SEMA4C	-1,2270	8,26E-04	LINC00652	-2,1927	5,71E-03
AC138969.1	1,2728	9,19E-03	PLS3	-1,2271	1,28E-03	ASGR1	-2,2025	1,33E-02
TMEM131	1,2725	1,05E-02	TUBB2A	-1,2280	4,45E-02	IL1A	-2,2138	1,63E-18
GFPT1	1,2724	8,24E-03	IGBP1	-1,2281	9,36E-04	PXYLP1	-2,2315	2,45E-45
MCM5	1,2722	2,23E-05	MAP3K12	-1,2281	4,04E-03	LINC02584	-2,2332	1,01E-02
AUNIP	1,2719	2,59E-02	GUCD1	-1,2286	5,84E-04	GPR37	-2,2389	7,40E-07
RAB3IP	1,2718	3,01E-02	THNSL2	-1,2287	4,90E-02	IL16	-2,2409	1,04E-19
PPP1R9A	1,2717	2,15E-02	SAAL1	-1,2293	1,66E-03	FZD4	-2,2416	4,52E-25
TP73	1,2716	2,34E-02	MT-ND3	-1,2293	2,85E-02	NFASC	-2,2452	2,82E-14
COL4A1	1,2714	1,78E-05	SLC14A1	-1,2297	1,85E-03	HAPLN1	-2,2611	1,84E-63
SMURF2	1,2712	9,25E-03	PDHX	-1,2300	1,57E-03	IL32	-2,2647	3,35E-04
RPE	1,2712	7,48E-05	NUSAP1	-1,2313	7,37E-04	GALNT18	-2,2675	1,01E-04
HSPA1B	1,2709	2,87E-05	STMN1	-1,2315	2,13E-04	FOXD3	-2,2691	1,72E-22
N4BP2L2	1,2701	2,91E-05	B4GALT6	-1,2317	3,35E-02	LAMA2	-2,2811	5,01E-18
DCAKD	1,2700	2,97E-02	TUBB6	-1,2317	4,80E-04	DGKI	-2,2821	1,86E-05
SCML2	1,2700	2,70E-02	SYTL5	-1,2332	1,78E-04	TMEM47	-2,2839	1,94E-52
DZIP1	1,2697	5,97E-05	PBK	-1,2335	1,58E-03	AC087190.3	-2,2904	3,39E-03
KIF1A	1,2696	3,58E-02	STAR4	-1,2340	4,03E-04	SHISAL1	-2,2925	7,30E-09
SYNE1	1,2695	1,13E-02	DIAPH2	-1,2342	4,13E-02	LAG3	-2,3012	1,18E-02
CLSPN	1,2688	1,17E-02	DCAF6	-1,2347	6,40E-04	TRIML2	-2,3012	5,63E-11
NUFI1	1,2687	2,17E-02	SUFU	-1,2347	2,10E-03	ZNF528-AS1	-2,3014	1,06E-05
AMOT	1,2687	1,99E-02	CAVIN1	-1,2349	1,33E-04	AC005324.2	-2,3068	2,04E-02
SPEN	1,2684	1,01E-02	TM2D3	-1,2351	2,36E-03	ZSCAN18	-2,3099	3,33E-15

GNAI1	1,2683	3,68E-02	FUT8	-1,2355	1,30E-03	GPR173	-2,3219	2,56E-03
PDXP	1,2682	1,69E-02	ZBTB38	-1,2355	2,49E-02	CITED1	-2,3348	2,04E-12
TAX1BP3	1,2682	8,94E-05	KIF2A	-1,2357	2,96E-02	PGM2L1	-2,3370	1,17E-10
SLC29A2	1,2679	4,99E-02	NR4A2	-1,2358	2,47E-03	MGAM	-2,3377	2,31E-02
XRCC3	1,2673	1,84E-02	NDUFB9	-1,2362	3,64E-04	AVIL	-2,3547	6,08E-07
SH2B3	1,2672	1,32E-05	NLGN2	-1,2365	5,50E-04	REM1	-2,3555	2,72E-02
KIAA1217	1,2669	3,06E-02	MMADHC	-1,2367	3,19E-04	ANG	-2,3569	1,62E-04
SLC12A4	1,2669	8,14E-05	KCNG1	-1,2369	2,63E-02	TSPAN15	-2,3654	3,91E-07
SESN1	1,2662	2,58E-02	GXYLT1	-1,2374	4,67E-02	OR51B5	-2,3702	6,49E-10
SRCAP	1,2661	4,53E-02	CEP70	-1,2378	4,06E-03	ADAMTS8	-2,3707	7,21E-03
CDH2	1,2661	2,09E-05	LIN7C	-1,2382	4,04E-02	SAA2	-2,3715	8,86E-03
ALG11	1,2661	1,45E-02	NDUFB8	-1,2389	2,84E-02	AC009063.3	-2,3739	1,65E-02
SLC16A7	1,2654	1,82E-02	EGLN1	-1,2390	3,58E-04	BTBD16	-2,3772	2,52E-02
SH3TC1	1,2651	2,52E-02	PTOV1	-1,2397	2,70E-02	FAM189A2	-2,3813	1,95E-05
ADAM23	1,2648	2,48E-02	MAGT1	-1,2408	3,33E-04	DMKN	-2,3918	2,09E-04
ALDH1L2	1,2647	1,14E-02	DENND10	-1,2411	2,14E-03	KDR	-2,3984	6,08E-20
WDHD1	1,2647	6,10E-04	GPI	-1,2413	8,42E-05	RNF128	-2,4064	3,71E-05
NCOR2	1,2646	1,26E-02	ARL6IP1	-1,2415	1,38E-04	C1S	-2,4092	6,79E-07
UBASH3B	1,2642	1,05E-02	ILK	-1,2416	4,65E-04	LINC01979	-2,4103	6,78E-03
RAVER2	1,2640	2,54E-02	IGFBP3	-1,2422	1,92E-02	COL11A1	-2,4153	3,69E-02
FAM169A	1,2640	2,96E-02	DRAM2	-1,2424	3,01E-03	GNAO1	-2,4305	4,17E-04
S100A4	1,2635	2,00E-05	OBSL1	-1,2434	2,21E-04	BARX1	-2,4314	1,64E-03
LSS	1,2631	6,25E-05	IER3	-1,2436	1,98E-02	LCN2	-2,4396	7,81E-19
ST3GAL3	1,2631	3,88E-02	AC068831.6	-1,2436	3,88E-02	LARGE1	-2,4401	4,41E-07
DAP	1,2623	2,99E-05	CDC20	-1,2438	3,01E-04	NTNG2	-2,4603	1,04E-02
NOTCH2NLC	1,2622	4,86E-02	TTK	-1,2455	4,06E-02	AC092447.5	-2,4649	4,18E-03
MTSS2	1,2621	1,27E-04	CD59	-1,2456	6,13E-05	CADM3	-2,4685	4,14E-02
ST3GAL4	1,2619	2,58E-05	MACIR	-1,2457	4,17E-04	IL2RG	-2,4784	3,53E-02
TRIM25	1,2616	2,58E-05	PSME1	-1,2457	3,44E-04	MATN4	-2,4845	1,05E-02
STN1	1,2608	2,32E-02	LPCAT4	-1,2463	4,43E-02	GLDC	-2,4879	8,78E-14
SLC46A1	1,2603	3,00E-02	GMFB	-1,2468	2,32E-04	CTXND1	-2,5096	2,26E-06
GTF2F2	1,2595	2,57E-04	KCNC3	-1,2469	4,14E-02	PLP1	-2,5109	3,19E-64
RRM2	1,2591	3,10E-05	KCTD9	-1,2471	2,16E-04	MFNG	-2,5172	8,09E-11
IVNS1ABP	1,2589	3,72E-05	TSPYL2	-1,2471	1,31E-03	FAM186B	-2,5228	1,42E-03
ARGLU1	1,2589	2,72E-05	ERII	-1,2475	1,39E-03	CD74	-2,5372	5,00E-38
SHROOM3	1,2587	2,06E-02	STX3	-1,2485	5,76E-04	ADGRD1	-2,5575	1,25E-02
IRF2BP1	1,2586	2,03E-02	BFAR	-1,2492	1,24E-04	AC068620.1	-2,5663	2,85E-02
DCTPP1	1,2584	2,28E-02	DEPDC1	-1,2494	2,59E-02	HLA-DMB	-2,5707	2,99E-12
ENOSF1	1,2583	2,83E-02	GYS1	-1,2499	3,63E-04	MATN2	-2,5743	1,07E-04
AKAP11	1,2583	1,45E-02	GGH	-1,2503	5,76E-04	SRGN	-2,5761	1,16E-02
CPT1A	1,2581	1,93E-04	BCAS3	-1,2503	4,00E-02	AL139398.1	-2,5765	4,82E-02
HECTD2	1,2576	3,64E-02	OSTC	-1,2504	1,84E-04	GPM6B	-2,5767	1,67E-02
WDR76	1,2567	1,98E-02	FAM214A	-1,2504	3,97E-02	CDC42EP5	-2,6026	3,31E-10
COL4A2	1,2566	2,77E-05	SPAG7	-1,2505	2,15E-02	TFAP2B	-2,6045	2,58E-33
MANEAL	1,2560	2,36E-02	ANLN	-1,2514	1,67E-02	FAM78B	-2,6161	2,00E-22
RGL1	1,2551	2,52E-02	BABAM2	-1,2520	3,28E-02	SPANXA1	-2,6175	4,84E-02
DIS3	1,2547	5,42E-05	BCKDHA	-1,2528	1,95E-04	BCL11A	-2,6253	1,24E-02
GEMIN5	1,2544	1,70E-04	MMGT1	-1,2531	1,43E-04	AC005280.2	-2,6347	3,59E-05
PDS5B	1,2543	1,52E-04	GPX4	-1,2533	1,76E-02	ATP10B	-2,6508	9,59E-04

USP36	1,2541	9,38E-05	TMEM132A	-1,2534	2,03E-02	AOC3	-2,6607	2,14E-03
TNXB	1,2539	3,69E-02	PAGE2	-1,2540	2,28E-02	ZNF835	-2,6658	2,56E-02
PCDHGA7	1,2538	2,94E-02	NTAN1	-1,2542	8,50E-04	RNF152	-2,6668	1,85E-06
TTL12	1,2535	1,61E-04	AEBP1	-1,2549	6,37E-05	S1PR1	-2,6704	2,30E-04
ANKRD13B	1,2535	4,45E-02	KIF2C	-1,2551	1,84E-04	RASD1	-2,6744	4,55E-03
KRT8	1,2532	2,51E-02	FAM3C	-1,2557	3,93E-05	UNC5CL	-2,6866	4,88E-03
MLXIP	1,2532	2,18E-04	COBL	-1,2560	5,07E-04	KRT6B	-2,6987	3,62E-04
RALGAPA1	1,2526	2,76E-02	CNP	-1,2561	3,83E-05	TPPP	-2,7038	3,68E-03
FGF2	1,2525	2,18E-02	BET1	-1,2563	3,16E-02	PRELP	-2,7072	1,97E-12
TMEM170A	1,2522	2,53E-02	SNAP23	-1,2568	1,84E-04	CLIC5	-2,7188	4,38E-02
MCM6	1,2518	7,94E-05	ID1	-1,2574	3,50E-02	AC018558.7	-2,7224	8,49E-04
ATF3	1,2517	6,06E-04	SPTBN5	-1,2579	2,55E-02	PGM5	-2,7268	2,06E-02
EZH2	1,2514	2,64E-04	VAMP4	-1,2580	3,78E-02	SYN1	-2,7394	4,55E-02
SLC35C1	1,2511	6,44E-04	RHOC	-1,2581	1,28E-02	AC104825.1	-2,7405	1,69E-04
VPS36	1,2509	1,52E-04	MYO1E	-1,2587	5,02E-05	CLEC18A	-2,7451	7,61E-06
TRAF5	1,2506	6,82E-04	TOP2A	-1,2589	1,20E-02	MACORIS	-2,7524	9,50E-04
PLAGL2	1,2503	3,21E-04	SLC2A3	-1,2593	2,03E-02	HLA-DRA	-2,7524	2,60E-43
PPARG	1,2503	4,44E-04	AF117829.1	-1,2596	8,29E-05	MEF2B	-2,7557	3,54E-05
JDP2	1,2502	3,53E-02	CU633967.1	-1,2600	3,66E-02	AC105046.1	-2,7560	9,37E-03
PMS1	1,2499	4,95E-02	LAMB2	-1,2602	2,68E-05	RAB7B	-2,7569	2,88E-25
HNRNPLL	1,2498	7,08E-04	RTKN	-1,2604	1,69E-04	RASD2	-2,7603	3,52E-03
GATD1	1,2497	5,24E-04	TBC1D3L	-1,2606	4,13E-02	C1QTNF12	-2,7859	3,44E-02
PICK1	1,2488	4,09E-02	ST3GAL5	-1,2620	2,63E-02	AL139289.1	-2,7871	2,82E-02
MPZL1	1,2487	3,92E-04	TUBG2	-1,2621	3,98E-02	NEK10	-2,7918	1,01E-04
SORBS2	1,2482	2,41E-04	MSMO1	-1,2629	1,94E-04	P2RX7	-2,8081	4,17E-02
NHSL1	1,2479	2,00E-04	HOMER3	-1,2632	1,64E-02	DEPP1	-2,8183	2,66E-05
SLC29A1	1,2477	3,67E-02	TOMM7	-1,2632	1,17E-02	AATK	-2,8527	2,16E-14
ATF7	1,2477	2,96E-02	RWDD1	-1,2635	2,11E-02	AC004837.4	-2,8578	4,27E-02
HSPA1A	1,2475	1,69E-04	SLC9A7	-1,2645	2,07E-02	NCAM1	-2,8656	3,28E-28
SLC39A8	1,2473	3,99E-02	STAT6	-1,2647	2,13E-04	KCNS3	-2,8937	1,60E-39
TNFRSF19	1,2471	7,40E-05	FTL	-1,2647	9,38E-03	DEPDC7	-2,9134	2,29E-40
MACF1	1,2468	1,76E-02	MRC2	-1,2650	3,79E-05	DNAAF4-CCPG1	-2,9405	1,02E-02
IL4R	1,2467	4,78E-02	PLXNB3	-1,2662	1,26E-02	KCNJ8	-2,9496	2,37E-02
DYNC2I2	1,2461	2,53E-02	HAUS4	-1,2666	1,61E-02	APBA1	-2,9679	2,73E-06
GLIS3	1,2460	3,47E-04	SEZ6L2	-1,2670	7,20E-05	LHFPL5	-2,9951	6,38E-03
GMNN	1,2460	3,11E-02	SLC17A9	-1,2672	1,83E-02	AC131009.2	-3,0327	2,24E-02
TAF1A	1,2460	3,72E-02	NPTN	-1,2673	2,58E-05	MAOA	-3,0390	2,64E-07
PAWR	1,2457	2,52E-02	CTHRC1	-1,2674	1,37E-02	HLA-DRB5	-3,0466	4,23E-41
CDC16	1,2453	1,44E-04	SIDT2	-1,2680	2,45E-02	HLA-DRB1	-3,0551	6,52E-90
CHD7	1,2451	2,82E-02	MMP17	-1,2685	2,11E-02	SRPK3	-3,0697	2,56E-04
SCMH1	1,2446	8,97E-04	MC1R	-1,2686	3,85E-02	AP005901.5	-3,0893	6,01E-03
PLEKHG5	1,2444	2,59E-04	GRAMD1A	-1,2687	1,69E-02	AC027329.1	-3,0980	2,72E-05
UPF3A	1,2443	2,57E-04	NRGN	-1,2687	3,78E-02	LINC01739	-3,1092	9,35E-07
S1PR2	1,2442	9,50E-04	BNIP3L	-1,2691	3,84E-05	REPS2	-3,1200	1,34E-05
TUFT1	1,2436	3,79E-02	CRELD1	-1,2694	2,34E-02	ABAT	-3,1574	1,78E-16
TATDN2	1,2432	3,17E-04	LBHD1	-1,2697	3,10E-02	ANK3	-3,1631	1,84E-48
FAM111B	1,2429	3,86E-02	EPHB2	-1,2699	3,51E-02	CLPSL2	-3,1643	2,14E-02
TBC1D9	1,2420	4,99E-02	PRCP	-1,2705	5,89E-05	ZNF727	-3,1911	4,06E-04
ZMYND19	1,2411	8,49E-04	PPP2R5D	-1,2709	4,17E-04	PLEKHS1	-3,2145	6,87E-03

IER5L	1,2411	4,66E-02	SLC16A4	-1,2710	4,54E-02	MYOZ2	-3,2222	2,17E-02
E2F1	1,2410	3,07E-04	NSMAF	-1,2712	8,49E-05	HLA-DQB1	-3,2243	9,10E-39
EEF2K	1,2410	9,41E-04	SLC25A29	-1,2716	1,72E-02	CD200	-3,2283	4,53E-09
HMGA2	1,2407	8,92E-05	MGST3	-1,2716	1,75E-02	LINCR-0003	-3,2310	4,72E-03
GOSR2	1,2405	2,57E-04	UBE2L6	-1,2718	1,80E-02	AC092143.1	-3,2533	7,07E-05
ZC3H13	1,2404	2,30E-02	OAT	-1,2721	1,54E-05	DUOX2	-3,2755	9,35E-04
KPNA3	1,2403	3,26E-04	TUBA1C	-1,2725	6,76E-06	AC036108.3	-3,2756	1,50E-02
EPHA2	1,2402	1,01E-04	PRC1	-1,2726	2,09E-05	AC068587.4	-3,2983	4,18E-03
TMEM120B	1,2394	4,00E-02	PBXIP1	-1,2733	1,54E-02	HGFAC	-3,2993	2,60E-02
ENTPD4	1,2394	2,89E-02	GNG12	-1,2738	6,99E-06	HBE1	-3,3031	2,06E-20
CXXC5	1,2390	4,54E-02	GULP1	-1,2739	8,12E-03	CALB1	-3,3202	9,86E-39
TMEM129	1,2390	4,09E-02	IQCJ-SCHIP1	-1,2741	6,98E-05	KLHL4	-3,3204	7,83E-05
TNFRSF10B	1,2389	1,26E-04	CEMIP	-1,2756	6,45E-03	ALPL	-3,3474	1,47E-02
RPP25	1,2379	3,25E-02	DSP	-1,2757	3,85E-02	AC021205.3	-3,3492	4,65E-02
MCM4	1,2377	1,14E-04	NFKBIZ	-1,2757	1,05E-04	ROPN1B	-3,3497	3,25E-05
ZBTB7A	1,2377	4,83E-02	GAPDH	-1,2760	5,95E-03	AC010332.3	-3,3640	2,45E-03
DHX33	1,2375	2,70E-02	FBXO7	-1,2769	1,65E-05	HHIP-AS1	-3,3969	2,34E-02
DLX1	1,2364	2,98E-03	TARS3	-1,2771	4,10E-02	PDCD6-AHRR	-3,4465	1,44E-02
VWA8	1,2357	3,89E-02	SNX33	-1,2778	1,41E-02	FBLN5	-3,4640	2,21E-04
SUV39H2	1,2355	4,94E-02	IGFBP6	-1,2781	1,43E-02	NPPC	-3,4855	3,69E-02
RIOX2	1,2354	8,23E-04	SOCS3	-1,2783	2,28E-02	AC104389.5	-3,5135	1,10E-08
KLHL42	1,2353	2,84E-02	PMM1	-1,2784	2,91E-02	AC009159.2	-3,5279	1,07E-02
SLC25A25	1,2352	1,15E-03	MXD4	-1,2786	2,90E-02	AC096536.2	-3,5813	1,41E-02
COA7	1,2341	5,19E-04	PRRG1	-1,2795	2,16E-02	HLA-DQB2	-3,6351	1,23E-03
EP400	1,2339	2,84E-02	NTM	-1,2800	2,12E-05	UBD	-3,6393	6,26E-03
GNPDA2	1,2337	4,42E-02	PCMTD1	-1,2804	5,47E-04	ACAN	-3,6452	2,80E-21
ERRFI1	1,2337	1,42E-04	SERINC2	-1,2807	2,04E-02	AC023796.1	-3,6514	4,68E-02
MPP6	1,2331	1,04E-03	POLD4	-1,2808	2,58E-02	LINC02732	-3,7455	2,94E-06
ZDBF2	1,2331	4,24E-02	MOAP1	-1,2813	1,24E-02	RAC2	-3,7542	1,40E-02
RNASEH1	1,2330	3,68E-04	HACL1	-1,2821	6,37E-05	AL158151.3	-3,7558	3,49E-02
TTLL4	1,2330	4,22E-02	ICAM5	-1,2825	2,01E-02	HLA-DOA	-3,7573	1,27E-21
SSBP4	1,2329	4,17E-02	FLOT1	-1,2832	9,54E-03	AC034102.2	-3,8082	1,62E-02
CLUH	1,2327	3,65E-04	PROCR	-1,2833	4,16E-04	LHX8	-3,8373	3,88E-07
KRT18	1,2327	2,69E-02	SEMA4G	-1,2834	4,08E-02	MAGEB2	-3,8481	2,89E-04
NT5C3A	1,2320	4,40E-02	NDC80	-1,2842	1,49E-02	ESPNL	-3,8738	4,83E-07
GFCF2	1,2309	1,77E-03	MXI1	-1,2847	1,23E-04	CPXM2	-3,8797	1,38E-06
STRIP1	1,2309	4,54E-02	PPP1R10	-1,2848	9,33E-06	KCNJ10	-3,9238	1,20E-02
XPC	1,2304	5,31E-04	LMBRD1	-1,2854	1,69E-02	ELMOD1	-3,9255	6,64E-08
CDC25A	1,2302	5,93E-04	GPC6	-1,2856	6,53E-03	AC009159.3	-3,9860	4,59E-10
ZNF562	1,2300	8,23E-04	ALPK1	-1,2856	1,74E-02	TRAF1	-4,0070	7,54E-70
PLXNB2	1,2297	3,35E-04	KDM3A	-1,2863	6,21E-03	CLEC18B	-4,0211	8,70E-05
CES2	1,2293	1,05E-03	SPA17	-1,2864	3,60E-02	TMPRSS15	-4,0224	5,98E-45
SH3D19	1,2293	4,78E-02	CTSF	-1,2864	6,97E-03	NPC1L1	-4,1202	1,35E-02
ATP2B1	1,2293	3,35E-04	ZNF827	-1,2873	1,50E-05	AC100847.1	-4,1219	4,56E-03
PHLDA2	1,2283	4,86E-02	C9orf16	-1,2874	9,63E-03	AC005821.1	-4,1803	4,87E-09
ETS1	1,2281	3,12E-02	ZNF853	-1,2890	1,58E-02	AC036214.3	-4,1829	1,39E-02
ITPRIP	1,2273	6,82E-04	ADAMTS1	-1,2896	6,03E-06	CASP1	-4,1879	1,65E-06
CFAP97	1,2272	4,66E-04	SLC1A4	-1,2897	1,67E-06	COL22A1	-4,1938	2,22E-55
CDKN1A	1,2271	2,48E-04	COL27A1	-1,2903	7,17E-06	GET1-SH3BGR	-4,2106	3,00E-03

SDC3	1,2270	2,81E-04	SULT1A3	-1,2906	2,34E-02	TCN1	-4,2474	4,63E-02
PRPS2	1,2266	6,14E-04	MAT2B	-1,2906	1,05E-05	GJA5	-4,2654	2,59E-02
SCFD2	1,2259	1,48E-03	FGFR4	-1,2908	1,65E-02	FAM83E	-4,2835	2,58E-02
SLC7A6	1,2256	6,10E-04	DMRT2	-1,2912	2,32E-02	AC244090.2	-4,2858	9,57E-03
ADAT1	1,2255	3,84E-02	ASPM	-1,2922	4,78E-03	SPANXB1	-4,3331	4,77E-12
BRI3BP	1,2251	9,73E-04	KDELR1	-1,2922	6,87E-06	SYNJ2BP-COX16	-4,4174	7,82E-05
SHLD2	1,2251	1,25E-03	SNUPN	-1,2929	2,73E-05	CACNG7	-4,4527	1,80E-02
LRP5	1,2249	2,06E-03	AC091057.1	-1,2930	2,88E-02	CNTN1	-4,4820	2,20E-14
UBIAD1	1,2239	1,30E-03	ACP6	-1,2938	2,38E-05	MAF	-4,5085	1,06E-158
TGFA	1,2238	3,36E-02	RHOB	-1,2947	9,63E-06	GPR26	-4,5468	1,26E-31
RAD50	1,2237	1,26E-03	KIF14	-1,2947	6,26E-03	AC015712.4	-4,7505	2,93E-03
GPATCH8	1,2236	3,93E-02	PRKCD	-1,2951	1,01E-05	HLA-DQA1	-4,7653	1,55E-48
MICAL3	1,2233	3,74E-02	EPHB3	-1,2952	1,05E-02	AL669830.1	-4,7810	3,60E-06
AKAP1	1,2233	8,70E-04	USP53	-1,2953	4,61E-03	ENPP2	-4,8851	1,52E-52
BRD9	1,2232	8,68E-04	SH3BGRL3	-1,2970	3,12E-03	RASAL1	-4,9748	5,20E-31
ZADH2	1,2226	4,90E-02	PINK1	-1,2972	8,84E-03	PRIMA1	-5,0056	8,65E-03
POLR1B	1,2224	3,85E-02	MFGE8	-1,2981	5,42E-06	SLC2A9	-5,0222	3,45E-04
SUCLA2	1,2222	2,42E-03	GSTM3	-1,2992	1,14E-02	LINC00349	-5,1069	7,34E-03
HSPH1	1,2217	4,19E-04	MAGEA11	-1,2992	7,46E-03	FAT3	-5,1906	6,35E-30
WDR43	1,2208	5,92E-04	VIM	-1,2998	2,54E-03	MAOB	-5,3802	2,78E-06
ITFG2	1,2208	4,89E-03	HNRNPA0	-1,3018	9,05E-07	HLA-DQA2	-5,6087	1,07E-40
TMEM164	1,2207	4,23E-03	SH3D21	-1,3021	1,05E-02	AP005901.6	-5,6662	5,82E-31
TRIOBP	1,2205	8,04E-04	AFAP1L2	-1,3021	1,25E-05	AC103858.3	-5,7122	8,22E-03
PIK3R2	1,2191	1,83E-03	RPS6KA1	-1,3022	7,29E-06	AC025470.2	-5,8086	1,45E-77
CEBPG	1,2190	6,07E-04	RAB2B	-1,3029	1,19E-02	AC009955.2	-5,9469	3,94E-02
GPR153	1,2180	1,09E-03	COPZ2	-1,3030	2,74E-02	NRXN3	-6,2935	1,24E-06
TOR3A	1,2177	1,44E-03	ANKRD10	-1,3034	1,26E-06	TRIM51	-6,3349	2,03E-06
TRIO	1,2175	4,19E-02	ARRDC3	-1,3034	4,52E-03	PCSK2	-6,4332	2,07E-03
AXIN1	1,2175	2,30E-03	CBLB	-1,3044	6,96E-03	HHIP	-6,6597	1,49E-12
SLC41A3	1,2169	2,70E-03	LINC00339	-1,3045	9,25E-03	TENM4	-6,6991	3,83E-04
DGKD	1,2157	2,90E-03	TGFBR2	-1,3045	3,75E-06	PTPN22	-6,7324	8,39E-15
MAST2	1,2151	2,24E-03	TMEM256	-1,3054	1,97E-02	C8orf44-SGK3	-7,0483	2,02E-02
TSPYL4	1,2143	3,38E-03	STRA6	-1,3059	1,10E-02	RXRG	-7,4794	4,84E-116
ATG12	1,2139	1,43E-03	LDHA	-1,3060	2,04E-03	DRAIC	-7,4828	4,65E-02
NDFIP2	1,2138	1,48E-03	SGCE	-1,3067	1,41E-04	AC007192.1	-7,7633	1,17E-02
FANCA	1,2137	3,18E-03	MIA	-1,3069	2,90E-03	BCHE	-7,8319	2,63E-13
EXOSC8	1,2131	2,21E-03	ACSS1	-1,3075	3,99E-02	MAP6D1	-7,8879	3,01E-03
PDE4A	1,2126	5,57E-03	CDCA8	-1,3082	4,51E-03	ZNF723	-8,0932	9,49E-03
IRAK1	1,2122	7,39E-04	SLC4A3	-1,3083	1,43E-02	AC100830.1	-8,1914	3,30E-02
KDM6B	1,2117	1,95E-03	GTF2IRD2B	-1,3083	4,50E-05	DAB1	-8,2971	7,69E-07
CCDC71L	1,2113	2,24E-03	SORBS3	-1,3085	6,12E-03	AC107884.1	-8,3744	1,30E-03
LIG4	1,2102	3,23E-03	AC016876.2	-1,3087	3,99E-05	POC1B-GALNT4	-8,4979	1,44E-02
EDRF1	1,2094	2,82E-03	MCF2L	-1,3089	1,48E-02	AP005901.2	-9,0700	4,46E-03
MZF1	1,2085	2,93E-03	PDK3	-1,3094	6,04E-03	DCT	-9,2820	5,27E-37
PLXNA1	1,2080	2,16E-03	INSIG1	-1,3095	8,62E-07	AL355075.4	-9,3509	6,57E-09
PHRF1	1,2079	3,57E-03	OCEL1	-1,3096	1,48E-02	LPAR4	-9,6622	1,74E-02
ZFP36L1	1,2070	1,48E-03	RGS3	-1,3141	5,18E-03	AC010422.6	-9,8673	2,16E-03
DPYSL3	1,2069	2,85E-03	GLA	-1,3154	8,51E-03	MTUS2-AS1	-10,2981	7,42E-06
TOP1	1,2069	1,10E-03	SDHC	-1,3158	7,40E-07	AC012184.2	-10,3063	9,46E-06

MDM2	1,2067	1,18E-03	DENND1B	-1,3159	1,32E-02	AC124864.2	-11,1324	9,62E-03
MICALL1	1,2067	1,51E-03	UBE2S	-1,3161	1,83E-03	AC009879.3	-11,9814	1,07E-02
PLCB3	1,2067	3,60E-03	KIF4A	-1,3163	2,74E-06	TLR9	-13,6385	1,88E-05
GTF2H2C	1,2055	2,91E-03	ARSG	-1,3165	2,32E-02	CT45A8	-14,2490	4,54E-02
ZNF598	1,2054	1,92E-03	CNTNAP1	-1,3167	1,86E-06	FOLH1	-15,0099	4,76E-11
INTS6	1,2048	3,64E-03	RAPGEFL1	-1,3177	4,09E-02	AC018521.1	-15,0161	4,50E-02
PACC1	1,2047	1,54E-02	HTATIP2	-1,3178	8,43E-03	ZP4	-17,8192	1,61E-02
MRPS31	1,2041	1,69E-02	SLC26A2	-1,3179	1,29E-03	AC020907.6	-18,0255	5,77E-06
HSDL2	1,2028	5,73E-03	RPL30	-1,3183	1,28E-03	FDCSP	-19,3777	3,18E-58
GART	1,2024	1,88E-03	TUBD1	-1,3187	2,49E-02	AL713999.1	-110,3706	4,16E-02
RFC2	1,2013	4,32E-03	B3GAT1	-1,3189	2,31E-02	AC012213.5	-110,4835	4,21E-02
TRNT1	1,2011	3,93E-03	RRAGD	-1,3190	6,87E-03			
DTWD1	1,2010	1,17E-02	WDR54	-1,3191	2,24E-03			
BOP1	1,2003	4,03E-03	MAN2B1	-1,3194	4,37E-07			
RAP1GAP2	1,2002	7,07E-03	CENPF	-1,3208	1,42E-03			

Tabela suplementar 5 – Vias moleculares GO (Gene Ontology) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) dos genes subexpressos (FDR p-value <0,05 e log₂ fold change <-2) nas células A375 shRMEL3 #4.

ID	Descrição	p.adjust	geneID
hsa05321	Inflammatory bowel disease	1,67E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/IL2RG/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/MAF/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05310	Asthma	1,67E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05332	Graft-versus-host disease	1,67E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04940	Type I diabetes mellitus	1,72E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05416	Viral myocarditis	4,09E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAMA2/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/RAC2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04514	Cell adhesion molecules	5,17E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/NRCAM/NFASC/NTNG2/CADM3/HLA-DMB/HLA-DRA/NCAM1/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/CNTN1/HLA-DQA1/HLA-DQA2/NRXN3
hsa05330	Allograft rejection	7,74E-12	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04672	Intestinal immune network for IgA production	1,48E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05320	Autoimmune thyroid disease	3,3E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04658	Th1 and Th2 cell differentiation	6,52E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL2RG/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/MAF/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05323	Rheumatoid arthritis	6,83E-10	ATP6V1C2/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05150	Staphylococcus aureus infection	9,19E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/C1R/HLA-DPB1/C1S/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05140	Leishmaniasis	9,19E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04612	Antigen processing and presentation	9,99E-10	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04145	Phagosome	2,31E-09	THBS2/ATP6V1C2/HLA-DPA1/HLA-DMA/C1R/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/RAB7B/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04659	Th17 cell differentiation	3,23E-09	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL2RG/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2/RXRG
hsa05145	Toxoplasmosis	4,83E-09	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAMA2/GNAO1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa04640	Hematopoietic cell lineage	1,35E-08	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05322	Systemic lupus erythematosus	4,9E-08	HLA-DPA1/HLA-DMA/C1R/HLA-DPB1/C1S/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05152	Tuberculosis	1,67E-07	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2/TLR9
hsa05164	Influenza A	7,06E-07	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL1A/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/CASP1/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05166	Human T-cell leukemia virus 1 infection	8,17E-05	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/IL2RG/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa05169	Epstein-Barr virus infection	0,000177	HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
hsa00360	Phenylalanine metabolism	0,000227	AOC2/AOC3/MAOA/MAOB
hsa00350	Tyrosine metabolism	0,000422	AOC2/AOC3/MAOA/MAOB/DCT
hsa00260	Glycine, serine and threonine metabolism	0,000683	AOC2/GLDC/AOC3/MAOA/MAOB

ID	Description	p.adjust	geneID
GO:0002495	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	1,68E-10	SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0043062	extracellular structure organization	3,21E-03	ABI3BP/COL19A1/MMP25/KLK2/HAPLN1/LAMA2/ADAMTS8/KDR/COL11A1/NTNG2/MATN4/GPM6B/FBLN5/ACAN/COL22A1
GO:0050708	regulation of protein secretion	1,06E-02	APOE/IL1A/ANG/SRGN/TFAP2B/C1QTNF12/P2RX7/KCNS3/HLA-DRB1/ABAT/CD200/GJA5/TLR9
GO:0099177	regulation of trans-synaptic signaling	4,39E-02	MCTP1/APOE/LAMA2/DGKI/NTNG2/SRGN/SYN1/APBA1/ABAT/CALB1/KCNJ10/CACNG7/BCHE
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	1,10E-04	HLA-DPA1/HLA-DPB1/HLA-DRA/RAB7B/NCAM1/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/CASP1/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0007626	locomotory behavior	6,61E-03	APOE/GPR37/FZD4/GNAO1/RASD2/APBA1/ABAT/CALB1/KCNJ10/DAB1
GO:0050670	regulation of lymphocyte proliferation	1,13E-02	HLA-DPA1/HLA-DPB1/IL1A/CD74/HLA-DMB/HLA-DRB1/RAC2/PTPN22/TLR9/ZP4
GO:0097485	neuron projection guidance	3,98E-02	SEMA3G/GFRA1/NRCAM/NFASC/LAMA2/MATN2/NCAM1/RAC2/NRXN3/DAB1
GO:0051604	protein maturation	4,40E-02	TMEM98/KLK2/C1R/TSPAN15/SRGN/P2RX7/HGFAC/CPXM2/CASP1/PCSK2
GO:0018958	phenol-containing compound metabolic process	3,24E-03	AOC2/GPR37/CITED1/MAOA/ABAT/DUOX2/MAOB/DCT
GO:0032675	regulation of interleukin-6 production	1,87E-02	IL1A/IL16/CD74/RAB7B/P2RX7/CD200/PTPN22/TLR9
GO:0007272	ensheathment of neurons	3,53E-02	TMEM98/PTPRZ1/NFASC/PLP1/TPPP/KCNJ10/TENM4
GO:0019226	transmission of nerve impulse	4,39E-02	NRCAM/NFASC/S1PR1/ANK3/CACNG7
GO:0042133	neurotransmitter metabolic process	1,87E-02	MAOA/ABAT/PRIMA1/MAOB
GO:0042417	dopamine metabolic process	3,97E-02	GPR37/MAOA/ABAT/MAOB
GO:0046717	acid secretion	4,51E-02	ABCB4/P2RX7/APBA1/ABAT
GO:0034163	regulation of toll-like receptor 9 signaling pathway	1,30E-02	RAB7B/PTPN22/TLR9

Tabela suplementar 6 - Vias moleculares GO (Gene Ontology) e KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) dos genes superexpressos (FDR p-value <0,05 e log₂ fold change >2) nas células A375 shRMEL3 #4.

ID	Description	q-value	geneID
hsa04512	ECM-receptor interaction	0,001479584	CD36/ITGA8/COL4A6/FREM1/ITGA1/RELN
hsa05414	Dilated cardiomyopathy	0,11570213	PLN/ITGA8/ITGA1/TGFB2
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0,11570213	THBD/SERPINE1/COL4A6/TGFB2
hsa00532	Glycosaminoglycan biosynthesis - chondroitin sulfate / dermatan sulfate	0,166822167	CHSY3/XYL1
hsa04510	Focal adhesion	0,166822167	ITGA8/PDGFD/COL4A6/ITGA1/RELN
hsa00534	Glycosaminoglycan biosynthesis - heparan sulfate / heparin	0,178089161	HS6ST3/XYL1
hsa04610	Complement and coagulation cascades	0,200671261	THBD/SERPINE1/C4B
hsa05210	Colorectal cancer	0,200671261	DCC/AREG/TGFB2
hsa05410	Hypertrophic cardiomyopathy	0,200671261	ITGA8/ITGA1/TGFB2
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	0,200671261	ITGA8/AREG/PDGFD/COL4A6/ITGA1/RELN
hsa04657	IL-17 signaling pathway	0,200671261	MAPK4/MUC5AC/MMP1
hsa04360	Axon guidance	0,228739081	UNC5D/DCC/TRPC3/EPHA3
hsa04928	Parathyroid hormone synthesis, secretion and action	0,232580891	BGLAP/PDE4B/GATA3
hsa05144	Malaria	0,297265574	CD36/TGFB2
hsa04979	Cholesterol metabolism	0,297265574	CD36/LIPG
hsa04024	cAMP signaling pathway	0,334235414	PLN/PPP1R1B/PDE4B/ADCYAP1
hsa05322	Systemic lupus erythematosus	0,334235414	C4B/H2AC18/H2BC11

ID	Description	qvalue	geneID
GO:0048015	phosphatidylinositol-mediated signaling	6,46E-03	PDGFD/CEACAM1/ROR1/TGFB2/MUC5AC/RELN/GATA3/F2RL1
GO:0048017	inositol lipid-mediated signaling	6,46E-03	PDGFD/CEACAM1/ROR1/TGFB2/MUC5AC/RELN/GATA3/F2RL1
GO:0014065	phosphatidylinositol 3-kinase signaling	8,31E-03	PDGFD/CEACAM1/ROR1/TGFB2/RELN/GATA3/F2RL1
GO:0014066	regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	2,00E-02	PDGFD/CEACAM1/ROR1/TGFB2/RELN/F2RL1
GO:0030193	regulation of blood coagulation	2,00E-02	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1
GO:1900046	regulation of hemostasis	2,00E-02	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1
GO:0014068	positive regulation of phosphatidylinositol 3-kinase signaling	2,00E-02	PDGFD/ROR1/TGFB2/RELN/F2RL1
GO:0050818	regulation of coagulation	2,00E-02	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1
GO:0051051	negative regulation of transport	2,96E-02	CD36/OSTN/PLN/ADCYAP1/CEACAM1/TFF2/NTSR1/EPHA3/APOD/HECW2
GO:0007160	cell-matrix adhesion	2,96E-02	CD36/ITGA8/SERPINE1/FREM1/ITGA1/EPHA3/APOD
GO:0031346	positive regulation of cell projection organization	2,96E-02	ADCYAP1/C15orf62/ANKRD1/SERPINE1/ROR1/EPHA3/RELN/UNC13A/F2RL1
GO:0014812	muscle cell migration	3,22E-02	MEGF10/IGFBP5/SERPINE1/PDGFD/SORL1
GO:0030206	chondroitin sulfate biosynthetic process	4,25E-02	CHSY3/VCAN/XYL1
GO:0030166	proteoglycan biosynthetic process	4,25E-02	CHSY3/VCAN/HS6ST3/XYL1
GO:0030194	positive regulation of blood coagulation	4,27E-02	CD36/THBD/SERPINE1
GO:1900048	positive regulation of hemostasis	4,27E-02	CD36/THBD/SERPINE1
GO:0022612	gland morphogenesis	4,27E-02	IGFBP5/AREG/CEACAM1/TGFB2/PROX1

Tabela suplementar 7: Análise dos termos GO com os genes regulados (FDR p-value 0,05; log₂ fold change <-1 e >1) após o silenciamento de RMEL3 nas células de melanoma A375.

ID	Descrição	p.adjust	geneID
GO:0022604	regulation of cell morphogenesis	1,46E-10	DCC/OSTN/PTPRO/C15orf62/HECW2/RELN/UNC13A/EPHA7/NTRK2/SPP1/BDNF/GRIP1/PLXND1/SEMA3C/NEFL/MYCBP2/FN1/WASF3/MYO10/EPHA4/CDC42EP1/STRIP2/SPART/TRAK1/FBXW8/PPP1R9A/KIF1A/CDH2/SHROOM3/MACF1/EEF2K/STRIP1/PLXNB2/SH3D19/TRIOBP/PLXNA1/RNF6/PDLIM5/PRPF40A/ANKRD27/RNF157/RHOQ/SS18L1/CUL7/ABL1/WDR36/LRP8/SPARC/CALR/FYN/PLXNB1/SRC/BRWD3/VAMP7/SEMA7A/P4HB/DPYSL2/ADAM10/DBN1/SEMA4C/ILK/OBSL1/ID1/RHOC/PLXNB3/EPHB2/SEMA4G/RHOB/EPHB3/CORO1C/SEMA3E/ZMYM3/PREX1/LZTS3/TANC2/KANK1/DLG4/NFATC4/FGD4/CHN1/CCL2/MYH14/TIAM2/EFNB3/ROBO1/NTN1/ATP10A/ZEB2/SHTN1/NGFR/BAMBI/SLIT2/UNC13D/ITGA7/PTN/S100B/LRRK2/SEMA3G/APOE/NRCAM/FZD4/KDR/NTNG2/CDC42EP5/BCL11A/RAC2/CACNG7/ENPP2/RASAL1/DAB1
GO:0007409	axonogenesis	5,21E-09	UNC5D/DCC/DCLK1/PTPRO/SPTB/EPHA3/RELN/GATA3/EPHA7/NTRK2/SPP1/PALLD/NTN4/LHX4/BDNF/PLXND1/EFNB2/SEMA3C/NEFL/SPTBN2/NOTCH1/TSKU/MYCBP2/FN1/GLI2/LAMA5/FBXO45/EPHA4/SPART/TRAK1/EXT1/BCL2/CDH2/MACF1/EPHA2/PLXNB2/TRIO/PLXNA1/RNF6/PLCG1/VCL/B4GALT5/ABL1/WDR36/APP/ALCAM/FYN/VASP/PLXNB1/GDNF/SRC/SEMA7A/NFIB/DPYSL2/DBN1/SEMA4C/STMN1/B4GALT6/NR4A2/ILK/COBL/CNP/SPTBN5/LAMB2/PLXNB3/NPTN/EPHB2/FLOT1/SEMA4G/EPHB3/KIF5C/SEMA3E/PTPRM/NUMB/CHN1/TIAM2/EFNB3/ROBO1/NTN1/LAMA1/ZEB2/SHTN1/NGFR/ROBO4/EPHB1/SLIT2/CHL1/CRMP1/S100B/SEMA3G/APOE/GFRA1/NRCAM/PTPRZ1/NFASC/LAMA2/NTNG2/MATN2/NCAM1/ANK3/RAC2/NRXN3/DAB1
GO:0030198	extracellular matrix organization	2,91E-13	ITGA8/SERPINE1/COL4A6/ITGA1/VCAN/TGFB2/ADAMTSL3/MMP1/COL9A1/TGFB1/SULF2/SPP1/NTN4/GAS6/FERMT1/COL4A5/ADAM19/CCN2/THSD4/FOXC2/DDR2/COL6A1/NOTCH1/COL9A3/SMOC1/FN1/COL5A1/LAMA5/RB1/PHLDB1/COL4A1/COL4A2/TNXB/FGF2/SLC39A8/ETS1/ITGA3/FOXC1/B4GALT1/DDR1/ITGB4/ABL1/SPARC/APP/QSOX1/CAV1/P4HA1/SMAD3/ADAM10/CRTAP/ANXA2/BGN/AEBP1/MYO1E/LAMB2/MMP17/ICAM5/FLOT1/ADAMTS1/COL27A1/FGFR4/MIA/LAMA4/LAMB3/FBN1/MMP15/ADAMTS6/LOXL2/CTSS/ADAMTS15/COL7A1/MMP2/ITGB8/LAMA1/THBS1/LOXL4/CCDC80/ADAMTS4/COL5A2/NID2/ADAMTSL1/ITGA7/COL16A1/COL15A1/SULF1/ABI3BP/COL19A1/MMP25/KLK2/HAPLN1/LAMA2/ADAMTS8/KDR/COL11A1/NTNG2/MATN4/GPM6B/FBLN5/ACAN/COL22A1
GO:0043062	extracellular structure organization	2,91E-13	ITGA8/SERPINE1/COL4A6/ITGA1/VCAN/TGFB2/ADAMTSL3/MMP1/COL9A1/TGFB1/SULF2/SPP1/NTN4/GAS6/FERMT1/COL4A5/ADAM19/CCN2/THSD4/FOXC2/DDR2/COL6A1/NOTCH1/COL9A3/SMOC1/FN1/COL5A1/LAMA5/RB1/PHLDB1/COL4A1/COL4A2/TNXB/FGF2/SLC39A8/ETS1/ITGA3/FOXC1/B4GALT1/DDR1/ITGB4/ABL1/SPARC/APP/QSOX1/CAV1/P4HA1/SMAD3/ADAM10/CRTAP/ANXA2/BGN/AEBP1/MYO1E/LAMB2/MMP17/ICAM5/FLOT1/ADAMTS1/COL27A1/FGFR4/MIA/LAMA4/LAMB3/FBN1/MMP15/ADAMTS6/LOXL2/CTSS/ADAMTS15/COL7A1/MMP2/ITGB8/LAMA1/THBS1/LOXL4/CCDC80/ADAMTS4/COL5A2/NID2/ADAMTSL1/ITGA7/COL16A1/COL15A1/SULF1/ABI3BP/COL19A1/MMP25/KLK2/HAPLN1/LAMA2/ADAMTS8/KDR/COL11A1/NTNG2/MATN4/GPM6B/FBLN5/ACAN/COL22A1
GO:0050769	positive regulation of neurogenesis	3,11E-06	ADCYAP1/ANKRD1/SERPINI1/ROR1/EPHA3/RELN/UNC13A/PROX1/NTRK2/RGS2/SERPINF1/BDNF/FUT9/GRIP1/DLX2/PLXND1/NEFL/CSF1/NOTCH1/LYN/FN1/GLI2/DICER1/EPHA4/IRX3/TRAK1/BCL2/FBXW8/PPP1R9A/TP73/SPEN/EZH2/PPARG/MACF1/E2F1/EEF2K/DLX1/PLXNB2/LIG4/PLXNA1/DPYSL3/ITGA3/LIF/ANKRD27/RNF157/KATNB1/ARHGFE2/SS18L1/CUL7/LRP8/P3H1/SOX10/TMEM30A/FYN/PLXNB1/VAMP7/SEMA7A/DBN1/HMG20B/SPAG9/ILK/OBSL1/COBL/PLXNB3/NPTN/EPHB2/ASPM/NUMB/ZMYND8/DLG4/FZD1/BCL6/TIAM2/ROBO1/NTN1/ZEB2/SOCS2/SHTN1/NGFR/MEF2C/SLIT2/PTN/IL1B/APOE/NRCAM/PTPRZ1/FZD4/AVIL/CACNG7/CNTN1/RASAL1/TENM4/DAB1/DCT
GO:0001667	ameboidal-type cell migration	1,61E-05	CEACAM1/S100P/TGFB2/GATA3/PROX1/TNS1/SERPINF1/PLXND1/MCC/EFNB2/SEMA3C/FERMT1/FOXC2/DDR2/CENPV/NOTCH1/CCN3/GADD45A/FN1/LAMA5/STC1/KLF4/FGFBP1/ROCK2/KANK2/TMEM201/SMURF2/AMOT/FGF2/PPARG/MACF1/PLEKHG5/EPHA2/ETS1/LRP5/PLCG1/ITGA3/ABL1/PIP5K1A/NUS1/SPARC/CALR/SPRED1/ANXA6/MAP4K4/SOX10/SASH1/GDNF/SRC/PLK2/SEMA7A/ACVR1/SEM A4C/GPI/ILK/MACIR/BCAS3/ANLN/ID1/PRCP/SEMA4G/RHOB/TGFB2/CORO1C/SEMA3E/PTPRM/RAB13/LPXN/CD40/KANK1/DUSP10/HSPB1/LOXL2/EGR3/ROBO1/THBS1/ZEB2/JUN/JUP/NR4A1/MEF2C/SLC8A1/NANOS1/SLIT2/HDAC9/PTN/SEMA3G/APOE/KDR/ENPP2
GO:0016049	cell growth	2,53E-04	DCC/OSTN/IGFBP5/DCLK1/CEACAM1/TGFB2/UNC13A/EPHA7/RGS4/SPP1/RGS2/SGK3/BDNF/SEMA3C/LEF1/SPOCK1/PLCE1/CCN3/FN1/SEN2/RB1/SPART/BCL2/KDM2B/HSPA1B/PPARG/SORBS2/HSPA1A/MACF1/CDKN1A/PLXNA1/RNF6/PDLIM5/VCL/CRLF3/DDR1/RNF157/ABL1/WDR36/SMARCA4/APP/ALCAM/CDKN1B/IGFBP4/CLSTN1/SEMA7A/NDRG3/BTG1/CAMK2D/SMAD3/DPYSL2/ADAM10/DBN1/RP S6KA3/SEMA4C/ILK/IGFBP3/TSPYL2/COBL/LAMB2/SEMA4G/KIF14/RP56KA1/TGFB2/SEMA3E/PSRC1/RARG/BCL6/CDKN2C/NTN1/ZEB2/SOCS2/SHTN1/AURKA/INHBA/SGK1/NANOS1/SLIT2/SEMA3G/AP OE/NRCAM/BCL11A/FBLN5/CACNG7/RASAL1/C8orf44-SGK3
GO:0001503	ossification	2,27E-06	OSTN/IGFBP5/AREG/BGLAP/VCAN/TGFB2/XYL1/RORB/LRP3/PPARGC1B/SPP1/SLC24A3/PTHLH/AT P6V0A4/LEF1/CSF1/CCN2/FOXC2/IFITM1/GNAS/DDR2/SMAD1/RUNX3/COL6A1/NOTCH1/FGFR3/SMO C1/SGMS2/GLI2/STC1/FASN/KLF10/JUNB/EXT1/BCL2/TUFT1/EPHA2/ATP2B1/LRP5/FSTL3/FOXC1/TM EM64/IARS1/SKI/TXLNG/SPARC/NBR1/IFT80/PLXNB1/SND1/RUNX1/SEMA7A/ACVR1/SMAD3/TOB1/S UFU/ILK/IGFBP3/ID1/MRC2/CTHRC1/SLC26A2/LGR4/FZD1/CEBPD/MMP2/ANKH/CHRD1/MEF2C/COL5A2/SLC8A1/PTN/TPH1/DHRS3/FAM20C/CITED1/COL11A1/SRGN/GPM6B/S1PR1/P2RX7/A LPL/NPPC
GO:0031346	positive regulation of cell projection organization	6,95E-07	ADCYAP1/C15orf62/ANKRD1/SERPINI1/ROR1/EPHA3/RELN/UNC13A/F2RL1/NTRK2/TENM2/RGS2/SER PINF1/BDNF/FUT9/RIPOR2/GRIP1/PLXND1/NEFL/PLCE1/LYN/FN1/EPHA4/CDC42EP1/CCP110/TRAK1/ FBXW8/PPP1R9A/DZIP1/EZH2/MACF1/EEF2K/PLXNB2/PLXNA1/DPYSL3/ITGA3/ANKRD27/RNF157/KA TNB1/RHOQ/SS18L1/ENTR1/CUL7/LRP8/P3H1/TMEM30A/FYN/PLXNB1/SRC/VAMP7/SEMA7A/DBN1/I LK/OBSL1/BCAS3/ANLN/COBL/PLXNB3/NPTN/CORO1C/ZMYND8/DLG4/FZD1/TIAM2/ROBO1/NTN1/Z EB2/SHTN1/TENM1/NGFR/SLIT2/PTN/APOE/FZD4/AVIL/LCN2/CDC42EP5/P2RX7/RAC2/CACNG7/CNT N1/ENPP2/RASAL1
GO:1903706	regulation of hemopoiesis	1,53E-03	BGLAP/CEACAM1/IKZF3/GATA3/INPP5D/PPARGC1B/H4C14/GAS6/ZBTB46/TESC/IL12A/LEF1/CSF1/M EIS2/GNAS/RUNX3/SLC9B2/NOTCH1/LYN/GLI2/KLF10/H4C15/FAM210B/RB1/MYL9/ZBTB7B/TNFSF9/ TP73/HSPA1B/N4BP2L2/UBASH3B/HSPA1A/IL4R/ETS1/FANCA/ZFP36L1/FSTL3/RBFOX2/LIF/FOXC1/T MEM64/PUS7/METTL3/ABL1/CUL4A/KAT2B/PSMA2/SOD1/PSMB2/RUNX1/TP53INP2/ANKH/CHRD1/ NFKBIZ/FBXO7/TGFB2/MEIS1/NDFIP1/RARG/DUSP10/FBN1/EGR3/BCL6/THBS1/HLA-

			B/FAXDC2/JUN/INHBA/BTN2A2/MEF2C/SOX13/NFATC2/DTX1/PTN/IL1B/IL1A/LAG3/CD74/RAB7B/HLA-DRB1/HLA-DOA/TLR9
GO:0050804	modulation of chemical synaptic transmission	1.60E-04	DCC/NPTX2/ADCYAP1/NTSR1/RELN/UNC13A/RGS4/NTRK2/F2R/BDNF/SORCS2/VGF/NPTXR/PLCB4/SYNGR1/PLCL2/EPHA4/CHRNA5/PPP1R9A/GNAI1/CDH2/PICK1/PLEKHG5/S1PR2/EIF4EBP2/PLCG1/NCDN/GIT1/ATAD1/ABL1/LRP8/APP/SYT11/PAIP2/FYN/ZDHHC3/CLSTN1/GDNF/SRC/PLK2/SLC12A2/DBN1/NLGN2/EGLN1/CDC20/STX3/NPTN/NRGN/EPHB2/FLOT1/PINK1/PLAT/ZMYND8/DLG4/NFATC4/CCL2/EFNB3/PLCB1/RAB3B/KCNC4/GRIK2/SLC24A2/MEF2C/GRM8/EPHB1/PTN/IL1B/S100B/LRRK2/MCTP1/APOE/LAMA2/DGKI/NTNG2/SRGN/SYN1/APBA1/ABAT/CALB1/KCNJ10/CACNG7/BCHE
GO:0099177	regulation of trans-synaptic signaling	1.72E-04	DCC/NPTX2/ADCYAP1/NTSR1/RELN/UNC13A/RGS4/NTRK2/F2R/BDNF/SORCS2/VGF/NPTXR/PLCB4/SYNGR1/PLCL2/EPHA4/CHRNA5/PPP1R9A/GNAI1/CDH2/PICK1/PLEKHG5/S1PR2/EIF4EBP2/PLCG1/NCDN/GIT1/ATAD1/ABL1/LRP8/APP/SYT11/PAIP2/FYN/ZDHHC3/CLSTN1/GDNF/SRC/PLK2/SLC12A2/DBN1/NLGN2/EGLN1/CDC20/STX3/NPTN/NRGN/EPHB2/FLOT1/PINK1/PLAT/ZMYND8/DLG4/NFATC4/CCL2/EFNB3/PLCB1/RAB3B/KCNC4/GRIK2/SLC24A2/MEF2C/GRM8/EPHB1/PTN/IL1B/S100B/LRRK2/MCTP1/APOE/LAMA2/DGKI/NTNG2/SRGN/SYN1/APBA1/ABAT/CALB1/KCNJ10/CACNG7/BCHE
GO:0034329	cell junction assembly	5.52E-05	PTPRO/GJB2/EPHA3/APOD/EPHA7/TNS1/NTRK2/IGFN1/ADGRL3/BDNF/PLXND1/FZD5/EFNB2/SPTBN2/ADGRF1/AMIGO2/FN1/FBXO45/TLN2/ANK2/ROCK2/BCL2/PPP1R9A/CDH2/MACF1/EEF2K/EPHA2/PLXNB2/PDLIM5/DUSP3/AJUBA/VCL/ITGB4/ABL1/PIP5K1A/APP/MAP4K4/VASP/CAV1/CLSTN1/PLXNB1/SRC/RUNX1/VMP1/SMAD3/NLGN2/ILK/OBSL1/BCAS3/RHOC/NPTN/EPHB2/FLOT1/GPC6/EPHB3/CNTNAP1/CORO1C/LAMB3/RAB13/FZD1/CD9/CDH19/NTN1/THBS1/UGT8/TRPV4/JUP/CLDN1/MEF2C/EPHB1/SORBS1/MDGA1/COL16A1/IL1B/THBS2/NRCAM/NFASC/KDR/NTNG2/GPM6B/GJA5
GO:0048732	gland development	1.19E-04	IGFBP5/AREG/ADCYAP1/CEACAM1/TGFB2/GATA3/PROX1/SULF2/ARNTN4/SERPINF1/PLXND1/SEMA3C/LEF1/CSF1/HOXD13/E2F7/CYP1A1/NOTCH1/GLI2/LAMA5/FASN/PPAT/BCL2L11/PKD1/ZBTB7B/BCL2/NCOR2/EZH2/SLC29A1/EPHA2/ETS1/LRP5/CEBPG/PLXNA1/PKD2/FSTL3/FOXC1/CAD/DDR1/GNPAT1/PCK2/ABL1/USF2/CDKN1B/SOX10/KDM5B/SOD1/CAV1/SRC/NFIB/SMAD3/JARID2/ARHGAP5/COBL/STAT6/EPHB3/RPS6KA1/TGFB2/STRA6/RPL30/HOXA3/IQGAP3/RARG/CITED2/CCDC40/PDGFBR/CCNB2/ROBO1/NTN1/LAMA1/SOCS2/DKK3/JUN/AURKA/TGM2/CLDN1/SERPINA5/PTN/SULF1/TPH1
GO:0043087	regulation of GTPase activity	2.06E-03	ADCYAP1/RGPD6/EPHA3/F2RL1/RGS4/CHN2/NTRK2/TBC1D30/F2R/RGS2/PLXND1/LRCH1/ARHGAP23/ARAP2/TBC1D19/EPHA4/ARHGAP10/EVIL/AMOT/TAX1BP3/MTSS2/RALGAP1/EZH2/TBC1D9/EPHA2/ERRF1/PLXNB2/PLXNA1/RAP1GAP2/RRP1B/AJUBA/ANKRD27/GIT1/RABGAP1/TBC1D16/SBF1/TBC1D14/PIP5K1A/IPO5/HACD3/MAP4K4/RAP1GDS1/SOD1/PLXNB1/RACGAP1/DEPDC1B/ARHGAP5/DEPDC1/BCAS3/RTKN/PLXNB3/EPHB3/RGS3/DENND1B/CORO1C/IQGAP3/PREX1/ARHGAP26/ARHGEP6/CD40/RGS10/FGD4/CHN1/CCL2/BCL6/TIAM2/PLCB1/SIPA1L2/JUN/PRKG1/ARHGAP31/ARHGAP24/SLIT2/RGS8/LRRK2/SEC23A/DGKI/S1PR1/ELMOD1/RASAL1
GO:0060537	muscle tissue development	2.34E-05	MEGF10/IGFBP5/PLN/ITGA8/ANKRD1/TGFB2/MYH15/PROX1/RGS4/BTG2/RGS2/RIPOR2/EFNB2/SEMA3C/NLN/LEF1/FOXC2/MAPK11/SMAD1/TIPARP/ZFPM2/NOTCH1/KLF5/RB1/BCL2/TP73/FGF2/ATF3/SORBS2/CHD7/KDM6B/PKD2/PDLIM5/FOXC1/FBXO22/LUC7L/SKI/CALR/SVIL/EMD/CAV1/SGCB/ACVR1/SMAD3/ERBB3/JARID2/HMG20B/EGLN1/OBSL1/DSP/FLOT1/TGFB2/STRA6/CENPF/MEIS1/VAMP5/FZD7/PDGFBR/MYH14/CCNB1/SOX6/MEF2C/SLC8A1/CXADR/EPHB1/CSRPT/HMGC/HDAC9/HEY2/S100B/COL19A1/MSC/COL11A1/S1PR1/PGM5/SRPK3/MYOZ2/GJA5/TENM4
GO:0042493	response to drug	1.53E-05	BGLAP/PDE4B/ANKRD1/APOD/TGFB2/GATA3/IGFBP2/ABCC3/BDNF/GAS6/TXNIP/SEMA3C/ABCA3/CYP1A1/GNAS/LYN/ABCC4/PPM1E/PPAT/SLC19A1/CTPS1/BCL2/TP73/SLC46A1/CPT1A/PPARG/PMS1/HMGA2/XPC/CDKN1A/PDE4A/TOPI1/MDM2/PFAS/ITGA3/CAD/LRP8/PARP4/CALR/CDKN1B/SOX10/TMEM30A/FYN/SOD1/ALAD/SRC/ADAM10/B2M/GGH/TGFB2/LDHA/CENPF/PTPRM/FZD1/PTGR1/FOSB/AM2/PDE3A/THBS1/CSAG2/MT2A/CCNB1/INHBA/CYP2E1/MEF2C/SLC8A1/NFATC2/PTN/IL1B/LCN2/TFAP2B/P2RX7/ABAT/NPPC/NPC1L1/MAOB/BCHE/DAB1
GO:0050808	synapse organization	2.66E-04	PTPRO/RELN/UNC13A/EPHA7/NTRK2/F2R/IGFN1/ADGRL3/NOS1AP/BDNF/PLXND1/FZD5/EFNB2/COL4A5/NEFL/SPTBN2/ADGRF1/AMIGO2/WASF3/FBXO45/EPHA4/PPP1R9A/COL4A1/KIF1A/CDH2/PICK1/EF2K/PLXNB2/PDLIM5/ITGA3/ABL1/LRP8/SPARC/APP/ARF4/FYN/CLSTN1/PLXNB1/GDNF/TUBB/ADAM10/DBN1/NLGN2/EGLN1/OBSL1/CDC20/LAMB2/NPTN/EPHB2/GPC6/EPHB3/DLG3/SEMA3E/C3/LZTS3/ZMYND8/TANC2/DLG4/FZD1/NFATC4/ABHD17C/PPFIA4/NTN1/NDRG1/MEF2C/EPHB1/MDGA1/PTN/TUBA1A/LRRK2/THBS2/APOE/NRCAM/NFASC/NTNG2/SRGN/SYN1/ANK3
GO:0045666	positive regulation of neuron differentiation	7.42E-06	ADCYAP1/ANKRD1/SERPINF1/ROR1/EPHA3/RELN/UNC13A/PROX1/NTRK2/RGS2/SERPINF1/BDNF/FUT9/GRIP1/DLX2/PLXND1/NEFL/LYN/FN1/GLI2/EPHA4/IRX3/TRAK1/BCL2/FBXW8/PPP1R9A/EZH2/MACF1/EEF2K/DLX1/PLXNB2/PLXNA1/DPYSL3/ITGA3/ANKRD27/RNF157/KATNB1/ARHGEP2/SS18L1/CU1L7/LRP8/P3H1/TMEM30A/FYN/PLXNB1/VAMP7/SEMA7A/DBN1/HMG20B/PAG9/ILK/OBSL1/COBL/PLXNB3/NPTN/ZMYND8/DLG4/FZD1/BCL6/TIAM2/ROBO1/NTN1/ZEB2/SOCS2/SHTN1/NGFR/MEF2C/SLIT2/PTN/APOE/NRCAM/FZD4/AVIL/CACNG7/CNTN1/RASAL1/DAB1
GO:0022407	regulation of cell-cell adhesion	6.48E-04	MEGF10/CEACAM1/GATA3/EPHA7/IGFBP2/FUT9/RIPOR2/AKNA/EFNB2/ADAM19/IL12A/LEF1/TNFRSF21/RUNX3/NOTCH1/LYN/SLC7A1/GLI2/MYO10/KLF4/ZBTB7B/TNFSF9/SH2B3/UBASH3B/IL4R/PAWR/ETS1/HSPH1/IRAK1/DUSP3/FSTL3/PIEZO1/METTL3/ABL1/CD55/CD276/FYN/CAV1/SRC/RUNX1/FXYD5/PLAUR/NFKBIZ/FLOT1/PRKCD/EPHB3/TGFB2/NDFIP1/HLA-A/DUSP10/CITED2/CD9/ARG2/EGR3/CCL2/BCL6/EFNB3/HLA-E/TRPV4/PRKG1/BTN2A2/SOX13/MDGA1/TNFSF14/DTX1/IL1B/HLA-DPA1/HLA-DPB1/IL1A/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRB1/ABAT/ANK3/PTPN22/ZP4
GO:0061458	reproductive system development	1.06E-03	GJB2/ADCYAP1/TGFB2/GATA3/SPPI1/AR/STC2/SERPINF1/LHX4/FZD5/ADAM19/LEF1/HOXD13/E2F7/VGF/GREB1L/TIPARP/ZFPM2/FNDC3A/NOTCH1/COL9A3/GLI2/STC1/JUNB/BCL2L11/PKD1/PLCD3/BCL2/FBXW8/KRT8/PPARG/CHD7/PHLDA2/FANCA/ZFP36L1/PKD2/FSTL3/ADGRG1/PLEKHA5/LIF/FOXC1/TYR03/DHX37/CUL7/ERCC1/DHCR24/CDKN1B/KDM5B/SOD1/SRC/WDR19/EGLN1/SOCS3/ADAMTS1/ASPM/STRA6/ETNK2/RAB13/RARG/LGR4/PLEKHA1/GJB3/CITED2/PDGFBR/ITGB8/INHBA/WNT2B/FST/SLIT2/SERPINA5/PTN/HEY2/SULF1/FZD4/CITED1/ANG/LHX8
GO:0045785	positive regulation of cell adhesion	5.16E-04	MEGF10/CD36/TGFB2/GATA3/IGFBP2/EFNB2/FERMT1/ADAM19/IL12A/LEF1/CSF1/FOXC2/RUNX3/LYN/SLC7A1/FN1/GLI2/MYO10/ZBTB7B/TNFSF9/IL4R/ETS1/HSPH1/TRIOBP/IRAK1/FSTL3/ADGRG1/PIEZO1/ITGA3/LIF/ABL1/CD55/CALR/CD276/MAP4K4/FYN/CAV1/SRC/RUNX1/P4HB/SMAD3/PLAUR/ILK/SRX3/NFKBIZ/FLOT1/TGFB2/PREX1/HLA-A/DUSP10/CITED2/EGR3/CCL2/BCL6/EFNB3/HLA-E/JUP/TGM2/BTN2A2/CCDC80/SOX13/UNC13D/TNFSF14/PTN/COL16A1/IL1B/ABI3BP/HLA-DPA1/HLA-DPB1/IL1A/KDR/CD74/HLA-DMB/ANK3/PTPN22/ZP4

GO:0048608	reproductive structure development	1,29E-03	GJB2/ADCYAP1/TGFB2/GATA3/SPP1/AR/STC2/SERPINF1/LHX4/FZD5/ADAM19/LEF1/HOXD13/E2F7/VGF/GREB1L/TIPARP/ZFPM2/FNDC2A/NOTCH1/COL9A3/GLI2/STC1/JUNB/BCL2L11/PKD1/PLCD3/BCL2/FBXW8/KRT8/PPARG/CHD7/PHLDA2/FANCA/ZFP36L1/PKD2/FSTL3/ADGRG1/LIF/FOXC1/TYRO3/DH X37/CUL7/ERCC1/DHCR24/CDKN1B/KDM5B/SOD1/SRC/WDR19/EGLN1/SOCS3/ADAMTS1/ASPM/STR A6/ETNK2/RAB13/RARG/LGR4/PLEKHA1/GJB3/CITED2/PDGFRB/ITGB8/INHBA/WNT2B/FST/SLIT2/SE RPINA5/PTN/HEY2/SULF1/FZD4/CITED1/ANG/LHX8
GO:0007517	muscle organ development	1,98E-04	MEGF10/ANKRD1/TGFB2/MYH15/PROX1/TAGLN/RGS4/BTG2/RGS2/RIPOR2/BORCS8-MEF2B/FGFRL1/EFNB2/NLN/LEF1/FOXC2/MAPK11/ZFPM2/NOTCH1/KLF5/LAMA5/TEAD4/RB1/BCL2/ TP73/FGF2/ATF3/CHD7/LIF/FOXC1/FBXO22/LUC7L/SKI/SVIL/EMD/CAV1/FXR1/SGCB/SMAD3/ERBB3/ JARID2/HMG20B/EGLN1/DSP/FLOT1/TGFB2/STRA6/SGCE/CENPF/MEIS1/VAMP5/FZD1/FZD7/EGR3/ MYH14/CCNB1/SOX6/MEF2C/CXADR/EPHB1/HMGCR/CAPN3/HDAC9/ITGA7/HEY2/S100B/COL19A1/M SC/LAMA2/COL11A1/LARGE1/S1PR1/MEF2B/SRPK3/MYOZ2
GO:0001933	negative regulation of protein phosphorylation	3,02E-03	PPP1R1B/PTPRO/CEACAM1/F2RL1/SORL1/RGS4/RGS2/TESC/PDE4D/LYN/CTDSPL/GADD45A/PPM1E/ KLF4/PER1/TRIB3/RB1/SPRED3/SH2B3/UBASH3B/ATF3/ERRF1/ITPRIP/CDKN1A/LRP5/PIK3R2/DUSP3/ DUSP4/LIF/CHORDC1/GPD1L/ABL1/ZMYND11/PO5/SPRED1/CDKN1B/KAT2B/CAV1/HEXIM1/DUSP14 /PARP14/IGBP1/PBK/ILK/IGFBP3/GMFB/EPHB2/PPP2R5D/FBXO7/SOCS3/PRKCD/PINK1/CBLB/RGS3/P MEPA1/CORO1C/DUSP10/HSPB1/DACT1/CDKN2C/DBNDD1/DUSP16/JUN/PLK1/CCNB1/BTN2A2/SLC8 A1/SLIT2/HMGCR/IL1B/LRRK2/APOE/P2RX7/PTPN22
GO:0014706	striated muscle tissue development	1,48E-04	MEGF10/PLN/ANKRD1/TGFB2/MYH15/PROX1/RGS4/BTG2/RGS2/RIPOR2/EFNB2/SEMA3C/NLN/LEF1/F OXC2/MAPK11/SMAD1/ZFPM2/NOTCH1/KLF5/RB1/BCL2/TP73/FGF2/ATF3/SORBS2/CHD7/KDM6B/PD LIM5/FOXC1/FBXO22/LUC7L/SKI/CALR/SVIL/EMD/CAV1/SGCB/ACVR1/SMAD3/ERBB3/JARID2/HMG 20B/EGLN1/OBSL1/DSP/FLOT1/TGFB2/CENPF/MEIS1/VAMP5/FZD7/PDGFRB/MYH14/CCNB1/SOX6/ MEF2C/SLC8A1/CXADR/EPHB1/HMGCR/HDAC9/HEY2/S100B/COL19A1/MSC/COL11A1/S1PR1/PGM5/S RPK3/MYOZ2/GJA5/TENM4
GO:0001558	regulation of cell growth	1,22E-03	DCC/OSTN/IGFBP5/CEACAM1/TGFB2/UNC13A/EPHA7/RGS4/SPP1/RGS2/SGK3/BDNF/SEMA3C/LEF1/S POCK1/PLCE1/CCN3/FN1/SES2/RB1/SPART/BCL2/KDM2B/HSPA1B/PPARG/HSPA1A/MACF1/CDKN1 A/RNF6/CRLF3/DDR1/RNF157/ABL1/WDR36/SMARCA4/CDKN1B/IGFBP4/CLSTN1/SEMA7A/NDRG3/B TG1/CAMK2D/SMAD3/DPYSL2/ADAM10/DBN1/RPS6KA3/SEMA4C/ILK/IGFBP3/TSPYL2/SEMA4G/KIF 14/RPS6KA1/SEMA3E/PSRC1/BCL6/CDKN2C/NTN1/SOCS2/SHTN1/INHBA/SGK1/NANOS1/SLIT2/SEMA 3G/APOE/NRCAM/BCL11A/FBLN5/CACNG7/RASAL1/C8orf44-SGK3
GO:0031589	cell-substrate adhesion	1,95E-05	CD36/ITGA8/SERPINE1/PTPRO/FREM1/ITGA1/EPHA3/APOD/NTN4/GAS6/FERMT1/CSF1/CCN2/SPOCK 1/NOTCH1/FN1/LAMA5/BCL2L11/ROCK2/PKD1/BCL2/MACF1/TRIOBP/DUSP3/AJUBA/VCL/ITGA3/DD R1/TYRO3/ITGB4/ABL1/PIP5K1A/CALR/MAP4K4/SRC/P4HB/SMAD3/CD63/ILK/BCAS3/ID1/LAMB2/KIF 14/EPHB3/SGCE/SORBS3/CORO1C/SEMA3E/BCAM/PREX1/LAMB3/LPXN/KANK1/FZD7/BCL6/THBS1/J UP/CCDC80/EPHB1/NID2/SORBS1/UNC13D/ITGA7/PTN/COL16A1/ABI3BP/FZD4/KDR/NTNG2/GPM6B/F BLN5/RAC2
GO:0010769	regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	3,00E-07	DCC/PTPRO/HECW2/RELN/EPHA7/NTRK2/SPP1/BDNF/PLXND1/SEMA3C/NEFL/MYCBP2/FN1/EPHA4/ SPART/TRAK1/FBXW8/PPP1R9A/KIF1A/CDH2/MACF1/EEF2K/PLXNB2/TRIOBP/PLXNA1/RNF6/PDLIM 5/ANKRD27/SS18L1/CUL7/ABL1/WDR36/LRP8/CALR/PLXNB1/VAMP7/SEMA7A/P4HB/DPYSL2/ADAM 10/DBN1/SEMA4C/ILK/OBSL1/ID1/PLXNB3/EPHB2/SEMA4G/EPHB3/CORO1C/SEMA3E/PREX1/LZTS3/ TANC2/KANK1/NFATC4/CHN1/TIAM2/EFNB3/ROBO1/NTN1/ZEB2/SHTN1/NGFR/SLIT2/UNC13D/LRRK 2/SEMA3G/APOE/NRCAM/DAB1
GO:0010721	negative regulation of cell development	9,62E-06	DCC/OSTN/PTPRO/ADCYAP1/SORL1/EPHA7/RGS4/SPP1/RGS2/BDNF/DLX2/PTH1H/CTS2/EFNB2/SEM A3C/NR2F1/SPOCK1/NOTCH1/DICER1/EPHA4/IRX3/SPART/BCL2/TP73/DLX1/DPYSL3/MDM2/RAP1GA P2/RNF6/ADGRG1/ARHGEF2/SKI/GAK/APP/CALR/SOX10/PLK2/SEMA7A/ITM2C/B2M/SEMA4C/ID1/EP HB2/SEMA4G/ASPM/VIM/CORO1C/MEIS1/SEMA3E/KANK1/DUSP10/NFATC4/FBN1/EFNB3/NTN1/TRP V4/TRPV1/NGFR/SLIT2/DTX1/PTN/CRMP1/IL1B/LRRK2/SEMA3G/TMEM98/APOE/GPR173/BCL11A/NP PC/DAB1
GO:0150063	visual system development	6,47E-04	HCN1/TGFB2/GATA3/MYH15/PROX1/RORB/NTRK2/IGFN1/SERPINF1/BDNF/DLX2/FZD5/NHS/CYP1A1/ FOXC2/MEIS2/TSKU/SMOC1/COL5A1/KLF4/SPRED3/BCL2/KDM2B/COL4A1/PDS5B/FGF2/CHD7/EPHA 2/DLX1/SLC25A25/ATP2B1/LRP5/LPCAT1/FOXC1/SKI/SMARCA4/SPRED1/CDKN1B/KDM5B/SMAD3/W DR19/OBSL1/LAMB2/EPHB2/VIM/TGFB2/STRA6/MEIS1/PTPRM/C3/RARG/FBN1/SIX5/BFSP1/PDGFR B/SHROOM2/LAMA1/ZEB2/JUN/CHRDL1/INHBA/COL5A2/WNT2B/EPHB1/MYO7A/PTN/FZD4/TFAP2B/ CALB1/MAF
GO:0048880	sensory system development	9,07E-04	HCN1/TGFB2/GATA3/MYH15/PROX1/RORB/NTRK2/IGFN1/SERPINF1/BDNF/DLX2/FZD5/NHS/CYP1A1/ FOXC2/MEIS2/TSKU/SMOC1/COL5A1/KLF4/SPRED3/BCL2/KDM2B/COL4A1/PDS5B/FGF2/CHD7/EPHA 2/DLX1/SLC25A25/ATP2B1/LRP5/LPCAT1/FOXC1/SKI/SMARCA4/SPRED1/CDKN1B/KDM5B/SMAD3/W DR19/OBSL1/LAMB2/EPHB2/VIM/TGFB2/STRA6/MEIS1/PTPRM/C3/RARG/FBN1/SIX5/BFSP1/PDGFR B/SHROOM2/LAMA1/ZEB2/JUN/CHRDL1/INHBA/COL5A2/WNT2B/EPHB1/MYO7A/PTN/FZD4/TFAP2B/ CALB1/MAF
GO:0009100	glycoprotein metabolic process	3,08E-03	CHSY3/VCAN/MUC5AC/HS6ST3/MUC15/XYLT1/B3GALT1/SULF2/FUT9/MGAT4C/GALNT13/ST8SIA4/ HS6ST2/GALNT10/B3GNT5/B3GLCT/MVD/CHST11/B3GAT3/TRAK1/EXT1/BCL2/GFPT1/ALG11/ST3GA L3/ST3GAL4/SLC35C1/SLC39A8/PAWR/TRIM13/B4GALT5/B4GALT1/DPM2/NUS1/TMT2C/BACE2/MPI1 TM2C/MAN2A2/LMAN1/BGN/B4GALT6/FUT8/GXYLT1/MAGT1/OSTC/ST3GAL5/PMM1/B3GAT1/MAN2 B1/ST6GAL1/GXYLT2/FBXO27/MANBA/DSEL/GBGT1/PLCB1/EXTL1/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8 SIA5/SPOCK3/SULF1/ST8SIA1/ASGR1/PXYLP1/GALNT18/COL11A1/LARGE1/ACAN
GO:0007411	axon guidance	4,59E-08	UNC5D/DCC/PTPRO/SPTB/EPHA3/RELN/GATA3/EPHA7/PALLD/NTN4/LHX4/BDNF/PLXND1/EFNB2/S EMA3C/SPTBN2/NOTCH1/MYCBP2/GLI2/LAMA5/EPHA4/EXT1/EPHA2/PLXNB2/TRIO/PLXNA1/PLCG1/ APP/ALCAM/FYN/VASP/PLXNB1/GDNF/SRC/SEMA7A/NFIB/DPYSL2/SEMA4C/SPTBN5/LAMB2/PLXN B3/NPTN/EPHB2/SEMA4G/EPHB3/KIF5C/SEMA3E/PTPRM/CHN1/EFNB3/ROBO1/NTN1/LAMA1/NGFR/ ROBO4/EPHB1/SLIT2/CHL1/CRMP1/SEMA3G/GFRA1/NRCAM/NFASC/LAMA2/MATN2/NCAM1/RAC2/ NRXN3/DAB1
GO:0097485	neuron projection guidance	4,59E-08	UNC5D/DCC/PTPRO/SPTB/EPHA3/RELN/GATA3/EPHA7/PALLD/NTN4/LHX4/BDNF/PLXND1/EFNB2/S EMA3C/SPTBN2/NOTCH1/MYCBP2/GLI2/LAMA5/EPHA4/EXT1/EPHA2/PLXNB2/TRIO/PLXNA1/PLCG1/ APP/ALCAM/FYN/VASP/PLXNB1/GDNF/SRC/SEMA7A/NFIB/DPYSL2/SEMA4C/SPTBN5/LAMB2/PLXN B3/NPTN/EPHB2/SEMA4G/EPHB3/KIF5C/SEMA3E/PTPRM/CHN1/EFNB3/ROBO1/NTN1/LAMA1/NGFR/ ROBO4/EPHB1/SLIT2/CHL1/CRMP1/SEMA3G/GFRA1/NRCAM/NFASC/LAMA2/MATN2/NCAM1/RAC2/ NRXN3/DAB1

GO:0001654	eye development	7,67E-04	HCN1/TGFB2/GATA3/MYH15/PROX1/RORB/NTRK2/IGFN1/SERPINF1/BDNF/DLX2/FZD5/NHS/CYP1A1/FOXC2/MEIS2/TSKU/SMOC1/COL5A1/KLF4/SPRED3/BCL2/KDM2B/COL4A1/PDS5B/FGF2/CHD7/EPHA2/DLX1/SLC25A25/ATP2B1/LRP5/LPCAT1/FOXCI/FOXCI/SKI/SMARCA4/SPRED1/CDKN1B/KDM5B/SMAD3/WDR19/OBSL1/LAMB2/EPHB2/VIM/TGFB2/STRAB6/MEIS1/PTPRM/RARG/FBN1/SIX5/BFSP1/PDGFBR/S/HROOM2/LAMA1/ZEB2/JUN/CHRD1/INHBA/COL5A2/WNT2B/EPHB1/MYO7A/PTN/FZD4/TFAP2B/CALB1/MAF
GO:0051961	negative regulation of nervous system development	7,08E-06	DCC/OSTN/PTPRO/ADCYAP1/SORL1/EPHA7/SPP1/BDNF/DLX2/CTS2/EFNB2/SEMA3C/TNFRSF21/NR2F1/SPOCK1/NOTCH1/DICER1/EPHA4/IRX3/SPART/PRKACB/TP73/DLX1/DPYSL3/MDM2/RAP1GAP2/RNF6/ADGRG1/ARHGFE2/SKI/GAK/APP/CALR/SOX10/PLK2/SEMA7A/ITM2C/GPR161/B2M/SEMA4C/SUFU/ID1/EPHB2/SEMA4G/ASPM/VIM/MEIS1/SEMA3E/KANK1/DUSP10/NFATC4/EFNB3/NTN1/TRPV4/TRPV1/NGFR/SLIT2/DTX1/PTN/CRMP1/IL1B/LRRK2/SEMA3G/TMEM98/APOE/GPR173/BCL11A/DAB1
GO:0010631	epithelial cell migration	3,26E-04	CEACAM1/S100P/TGFB2/GATA3/PROX1/SERPINF1/PLXND1/MCC/EFNB2/FERMT1/FOXC2/NOTCH1/CN3/GADD45A/STC1/KLF4/FGFBP1/ROCK2/KANK2/AMOT/FGF2/PPARG/MACF1/PLEKHG5/EPHA2/ET S1/PLCG1/ITGA3/ABL1/NUS1/SPARC/CALR/SPRED1/MAP4K4/SASH1/SRC/PLK2/GPI/BCAS3/ANLN/ID1/PRCP/RHOB/TGFB2/CORO1C/PTPRM/RAB13/LPXN/CD40/KANK1/DUSP10/HSPB1/LOXL2/EGR3/ROB O1/THBS1/ZEB2/JUN/JUP/NR4A1/MEF2C/NANOS1/SLIT2/HDAC9/PTN/APOE/KDR/ENPP2
GO:0090132	epithelium migration	4,29E-04	CEACAM1/S100P/TGFB2/GATA3/PROX1/SERPINF1/PLXND1/MCC/EFNB2/FERMT1/FOXC2/NOTCH1/CN3/GADD45A/STC1/KLF4/FGFBP1/ROCK2/KANK2/AMOT/FGF2/PPARG/MACF1/PLEKHG5/EPHA2/ET S1/PLCG1/ITGA3/ABL1/NUS1/SPARC/CALR/SPRED1/MAP4K4/SASH1/SRC/PLK2/GPI/BCAS3/ANLN/ID1/PRCP/RHOB/TGFB2/CORO1C/PTPRM/RAB13/LPXN/CD40/KANK1/DUSP10/HSPB1/LOXL2/EGR3/ROB O1/THBS1/ZEB2/JUN/JUP/NR4A1/MEF2C/NANOS1/SLIT2/HDAC9/PTN/APOE/KDR/ENPP2
GO:0090130	tissue migration	6,48E-04	CEACAM1/S100P/TGFB2/GATA3/PROX1/SERPINF1/PLXND1/MCC/EFNB2/FERMT1/FOXC2/NOTCH1/CN3/GADD45A/STC1/KLF4/FGFBP1/ROCK2/KANK2/AMOT/FGF2/PPARG/MACF1/PLEKHG5/EPHA2/ET S1/PLCG1/ITGA3/ABL1/NUS1/SPARC/CALR/SPRED1/MAP4K4/SASH1/SRC/PLK2/GPI/BCAS3/ANLN/ID1/PRCP/RHOB/TGFB2/CORO1C/PTPRM/RAB13/LPXN/CD40/KANK1/DUSP10/HSPB1/LOXL2/EGR3/ROB O1/THBS1/ZEB2/JUN/JUP/NR4A1/MEF2C/NANOS1/SLIT2/HDAC9/PTN/APOE/KDR/ENPP2
GO:0030900	forebrain development	1,95E-03	DCLK1/ADCYAP1/RELN/PROX1/NTRK2/BTG2/AKNA/DLX2/NEFL/LEF1/NOTCH1/TSKU/GLI2/IGF2BP1/FBXO45/EXT1/KDM2B/KIF1A/CDH2/NOTCH2NLC/EZH2/CHD7/E2F1/DLX1/ETS1/KDM6B/GART/ADGRG1/SECISBP2/TYRO3/METTL3/SKI/LRP8/APP/FYN/BTBD3/SRC/SEMA7A/BBS2/NFIB/SUN2/B2M/NR4A2/CNP/NRGN/EPHB2/GNG12/ASPM/KIF14/EPHB3/CORO1C/NUMB/ROBO1/PLCB1/ZEB2/PRKG1/BNIP3/INHBA/SLC8A1/WNT2B/SLIT2/PTN/BCL2A1/LRRK2/MYO1D/LHX8/DAB1/DCT
GO:1901653	cellular response to peptide	2,77E-03	CD36/BGLAP/GJB2/CEACAM1/GDF15/IRS4/SORL1/IRS1/ATP6V0A4/FOXC2/LYN/KLF5/KLF10/KLF4/EPHA4/PPAT/BCL2L11/TRIB3/ROCK2/PRKACB/ZBTB7B/PPARG/EEF2K/ERRF1/ATP2B1/PIK3R2/ZFP36L1/MDM2/EIF4EBP2/RHOQ/ARHGFE2/PCK2/GOT1/ADCY3/RPS6KB1/APP/LEPROT/KAT2B/CASP4/CYCL AV1/SRC/ATP6V1C1/ATP6V0E1/NR4A2/ID1/STAT6/SOCS3/PRKCD/VIM/INSIG1/RAB13/KANK1/FBN1/ERFE/SOCS2/NGFR/NR4A1/SORBS1/HDAC9/ANO1/KLF2/IL1B/SESN3/ATP6V1C2/GPR173/C1QTNF12/PTPN22
GO:0001655	urogenital system development	2,87E-05	ITGA8/IRX1/PDGFDP/PTPRO/TGFB2/GATA3/PROX1/EPHA7/SULF2/AR/SERPINF1/BDNF/EFNB2/GLIS2/HOXD13/GREB1L/ODC1/FOXC2/SMAD1/PLCE1/TIPARP/NOTCH1/GLI2/LAMA5/EPHA4/PPAT/IRX3/BC L2L11/PKD1/KANK2/BCL2/TP73/COL4A1/FGF2/PKD2/FSTL3/NLE1/ITGA3/LIF/FOXC1/CDKN1B/GDNF/SMAD3/ILK/MYO1E/LAMB2/MMP17/EPHB2/ADAMTS1/EPHB3/STRAB6/CENPF/RARG/LGR4/FBN1/ARG 2/PDGFBR/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SLIT2/LRRK2/SULF1/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:0048638	regulation of developmental growth	2,34E-04	DCC/OSTN/GDF15/UNC13A/PROX1/EPHA7/RGS4/SPP1/AR/STC2/RGS2/BDNF/SEMA3C/CSF1/FOXC2/MAPK11/ZFPM2/NOTCH1/FGFR3/FN1/WWC1/WWC2/BCL2L11/SPART/BCL2/TP73/FGF2/MACF1/CHD7/P HLD2/CDKN1A/RNF6/FOXC1/RNF157/ABL1/WDR36/APP/CDKN1B/SOD1/SEMA7A/BBS2/DPYSL2/DB N1/JARID2/SEMA4C/ILK/SEMA4G/TGFB2/MEIS1/SEMA3E/DUSP10/PLCB1/NTN1/SOCS2/SHTN1/CCN B1/MEF2C/CXADR/CAPN3/HEY2/SEMA3G/APOE/NRCAM/BCL11A/NPPC/CACNG7/RASAL1
GO:0042063	gliogenesis	1,36E-05	AREG/ADCYAP1/ROR1/ROR1/NTRK2/DLX2/LEF1/CSF1/TNFRSF21/NOTCH1/LYN/WASF3/GPR1 57/DICER1/EPHA4/TP73/CDH2/EZH2/PPARG/PICK1/E2F1/DLX1/ADGRG1/B4GALT5/LIF/METTL3/ABL1 /SKI/APP/SOX10/SOD1/BACE2/NFIB/SUN2/ERBB3/GSN/B4GALT6/ILK/CNP/LAMB2/VIM/CNTNAP1/DU SP10/CD9/MYRF/CCL2/CDKN2C/NDRG1/BNIP3/SOX6/SOX13/DTX1/PTN/IL1B/S100B/TMEM98/PTPRZ1/ LAMA2/PLP1/MATN2/TPPP/KCNJ10/TENM4/DAB1
GO:0060562	epithelial tube morphogenesis	1,18E-04	IRX1/AREG/TGFB2/GATA3/PROX1/EDNRA/EPHA7/AR/PLXND1/CTS2/EFNB2/LEF1/CSF1/GREB1L/FO XC2/NOTCH1/GLI2/LAMA5/EPHA4/IRX3/SETDB2/PKD1/PRKACB/BCL2/KDM2B/COL4A1/SHROOM3/F GF2/EPHA2/PLXNB2/LRP5/PKD2/DDR1/ABL1/SKI/KDM5B/VASP/GDNF/SRC/ACVR1/SMAD3/SEMA4C/ SUFU/ILK/COBL/CTHRC1/RHOB/TGFB2/SEMA3E/RARG/LGR4/FZD1/NFATC4/CCDC40/WNK4/NTN1/ LAMA1/ZEB2/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SLIT2/CITED1/KDR/HHP
GO:0030111	regulation of Wnt signaling pathway	2,66E-03	PTPRO/TRABD2B/SULF2/IGFBP2/BICC1/MCC/FERMT1/LEF1/NOTCH1/TSKU/SMURF2/TAX1BP3/CDH2 /MACF1/AXIN1/DDIT3/NLE1/ITGA3/TMEM64/ABL1/SKI/SMARCA4/APP/EMD/SOX10/IGFBP4/IFT80/PS MA2/PSMB2/TLE4/CAV1/SRC/RUNX1/SMAD3/PSMA7/PSMB4/DEPDC1B/CCNY/ILK/PSME1/CTHRC1/ GFBP6/ASPM/TLE3/LGR4/KANK1/FZD1/PLEKHA4/DACT1/NFATC4/FZD7/MLLT3/TLE2/ZEB2/DKK3/JU P/BAMBI/RBMS3/LRRK2/SULF1/APOE/ATP6V1C2/FZD4/CITED1/BARX1
GO:0048545	response to steroid hormone	6,53E-04	AREG/BGLAP/GJB2/ADCYAP1/TGFB2/PPARGC1B/IGFBP2/SPP1/AR/SERPINF1/TXNIP/DNAAF4/NEFL/ ABCA3/LEF1/CCN2/PAPPA/NOTCH1/STC1/BCL2L11/PER1/KANK2/BCL2/NCOR2/ZBTB7A/ERRF1/ATP 2B1/CDKN1A/AXIN1/ZFP36L1/MDM2/RNF6/SKP2/RBFOX2/CAD/UFM1/PCK2/GOT1/SMARCA4/SPARC/ CALR/SOX10/WBP2/ALAD/CAV1/SRC/RUNX1/RWDD1/KDM3A/TGFB2/PMPEA1/FBXO32/FOSB/KLF9 /THBS1/CLDN1/SLIT2/CPN1/PTN/S100B/ALPL/MAOB/RXRG/BCHE
GO:0010976	positive regulation of neuron projection development	9,26E-06	ADCYAP1/ANKRD1/SERPINF1/ROR1/EPHA3/RELN/UNC13A/NTRK2/RGS2/SERPINF1/BDNF/FUT9/GRIP 1/PLXND1/NEFL/LYN/FN1/EPHA4/TRAK1/FBXW8/PPP1R9A/EZH2/MACF1/EEF2K/PLXNB2/PLXNA1/D PYSL3/ITGA3/ANKRD27/RNF157/KATNB1/SS18L1/CUL7/LRP8/P3H1/TMEM30A/FYN/PLXNB1/VAMP7/ SEMA7A/DBN1/ILK/OBSL1/COBL/PLXNB3/NPTN/ZMYND8/DLG4/FZD1/TIAM2/ROBO1/NTN1/ZEB2/S HTN1/NGFR/SLIT2/PTN/APOE/FZD4/AVIL/CACNG7/CNTN1/RASAL1
GO:0050768	negative regulation of neurogenesis	1,43E-05	DCC/OSTN/PTPRO/ADCYAP1/SORL1/EPHA7/SPP1/BDNF/DLX2/CTS2/EFNB2/SEMA3C/NR2F1/SPOCK1 /NOTCH1/DICER1/EPHA4/IRX3/SPART/TP73/DLX1/DPYSL3/MDM2/RAP1GAP2/RNF6/ADGRG1/ARHG E2/SKI/GAK/APP/CALR/SOX10/PLK2/SEMA7A/ITM2C/B2M/SEMA4C/ID1/EPHB2/SEMA4G/ASPM/VIM/ MEIS1/SEMA3E/KANK1/DUSP10/NFATC4/EFNB3/NTN1/TRPV4/NGFR/SLIT2/DTX1/PTN/CRMP1/IL1B/L RRK2/SEMA3G/TMEM98/APOE/GPR173/BCL11A/DAB1
GO:0043687	post-translational	3,08E-03	IGFBP5/VCAN/CHGB/SPP1/STC2/GAS6/C4A/CSF1/VGF/UCLH3/FN1/KBTBD8/ANO8/DTL/FBXW8/CDH2 /KLHL42/ATG12/FSTL3/SKP2/ICMT/FBXO22/PTP442/CUL7/CUL4A/APP/QSOX1/P3H1/KLHL21/IGFBP4/

	protein modification		PSMA2/PSMB2/P4HB/WIPI2/PSMA7/UBE2F/ADAM10/CRTAP/PSMB4/PDIA6/DCAF6/IGFBP3/OBSL1/PSME1/TMEM132A/LAMB2/FBXO7/SOCS3/MFGE8/C3/WSB2/RAB13/FBXO27/FBXO32/FBN1/SOCS2/CHRD/L1/PRSS23/APOE/FAM20C/FBXL7/UBD/FOLH1
GO:0009101	glycoprotein biosynthetic process	1,34E-03	CHSY3/VCAN/MUC5AC/HS6T3/MUC15/XYLTI1/B3GALT1/FUT9/MGAT4C/GALNT13/ST8SIA4/HS6ST2/GALNT10/B3GNT5/B3GLCT/MVD/CHST11/B3GAT3/TRAK1/EXT1/BCL2/GFPT1/ALG11/ST3GAL3/ST3GAL4/SLC35C1/SLC39A8/PAWR/B4GALT5/B4GALT1/DPM2/NUS1/TMTC2/BACE2/MPI/ITM2C/MAN2A2/LMAN1/BGN/B4GALT6/FUT8/GXYLT1/MAGT1/OSTC/ST3GAL5/PMM1/B3GAT1/ST6GAL1/GXYLT2/DS EL/GBGT1/PLCB1/EXTL1/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/ASGR1/PXYLP1/GALNT18/LARGE1/ACAN
GO:0007599	hemostasis	2,02E-03	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/TRPC3/GATA3/F2RL1/F2R/F2RL2/GAS6/DGKH/P2RX5/GNAS/ZFPM2/LYN/FN1/PROS1/PRKACB/MYL9/SH2B3/UBASH3B/AKAP1/DGKD/MAFG/VCL/EHD1/TYRO3/GNA11/FYN/CAV1/SRC/PLAUR/HMG20B/LMAN1/ANXA2/VKORC1/GPI/ILK/CD59/EPHB2/PRCP/PROCR/PRKCD/ITPR2/EHD3/PLAT/CD40/HSPB1/CD9/PLA2G4A/PAPSS2/THBS1/GNG2/HPS5/PRKG1/SERPINA5/APOE/DGKI/P2RX7/ABAT/HGFAC/HBE1
GO:0072001	renal system development	3,51E-05	ITGA8/IRX1/PDGFD/PTPRO/TGFB2/GATA3/PROX1/EPHA7/SULF2/SERPINF1/BDNF/EFNB2/GLIS2/GREB1L/ODC1/FOXC2/SMAD1/PLCE1/TIPARP/NOTCH1/GLI2/LAMA5/EPHA4/PPAT/IRX3/BCL2L11/PKD1/KANK2/BCL2/TP73/COL4A1/FGF2/PKD2/FSTL3/NLE1/ITGA3/LIF/FOXC1/GDNF/SMAD3/ILK/MYO1E/LAMB2/MMP17/ADAMTS1/STRA6/CENPF/LGR4/FBN1/ARG2/PDGFRB/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SLIT2/LRRK2/SULF1/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:0051056	regulation of small GTPase mediated signal transduction	5,84E-04	TGFB2/RELN/F2RL1/CHN2/F2R/F2RL2/RIPOR2/CSF1/PLCE1/NOTCH1/LYN/ARHGAP23/ARAP2/ARHGAP10/ARHGEF4/KANK2/AMOT/RALGAP1/PLEKHG5/PIK3R2/TRIO/RAP1GAP2/ADGRG1/ITGA3/CYTH1/RHOQ/ARHGEF2/ABL1/MAP4K4/SRC/RACGAP1/DEPDC1B/ARHGAP5/STMN1/RHOC/EPHB2/FLOT1/RHOB/KIF14/MCF2L/PREX1/ARHGAP26/ARHGEF6/KANK1/FGD4/CHN1/BCL6/PDGFRB/RALGPS2/TIAM2/ROBO1/SIPA1L2/ARHGAP31/ARHGAP24/SLIT2/APOE/DGKI/DEPDC7/RAC2/RASAL1/LPAR4
GO:0043010	camera-type eye development	1,09E-03	HCN1/TGFB2/GATA3/MYH15/PROX1/RORB/NTRK2/IGFN1/SERPINF1/DLX2/FZD5/NHS/CYP1A1/FOXC2/2TSKU/KLF4/SPRED3/KDM2B/COL4A1/PDS5B/FGF2/CHD7/EPHA2/DLX1/SLC25A25/ATP2B1/LRP5/LPCAT1/FOXC1/SKI/SMARCA4/SPRED1/CDKN1B/KDM5B/SMAD3/WDR19/OBSL1/LAMB2/EPHB2/VIM/TGFB2/STRA6/MEIS1/PTPRM/RARG/FBN1/SIX5/BFSP1/PDGFRB/SHROOM2/LAMA1/ZEB2/JUN/INHBA/WNT2B/EPHB1/PTN/FZD4/TFAP2B/CALB1/MAF
GO:1903829	positive regulation of cellular protein localization	1,64E-03	EPHA3/ABCA12/SORL1/GAS6/FZD5/GLIS2/PMAIP1/PLK3/SESN2/XPO4/B3GAT3/ROCK2/BCL2/TP73/GNA11/USP36/E2F1/EPHA2/PIK3R2/MDM2/ITGA3/LIF/GPD1L/SAE1/ENTR1/IPO5/LEPROT/SYT11/TCAF1/EMD/TMEM30A/FYN/YWHAQ/MFF/SRC/SMAD3/EPB41L2/STX3/BCAS3/TOMM7/NPTN/EPHB2/CEMIP/SNX33/NDC80/PRKCD/PINK1/CLIP3/GTSE1/ABHD17C/SLC5A3/TENM1/JUP/PLK1/NGFR/TCAF2/SORBS1/PTN/IL1B/ANK3/RAC2
GO:0043405	regulation of MAP kinase activity	2,13E-03	PDGFD/ITGA1/GDF15/SORL1/RGS4/F2R/RGS2/FZD5/MAPK11/PLCE1/LYN/GADD45A/EPHA4/MAP3K21/TRIB3/SPRED3/TP73/SH2B3/FGF2/EZH2/S1PR2/TGFA/IRAK1/DUSP3/AJUBA/DUSP4/HACD3/SPRED1/SOD1/SASH1/CAV1/SRC/DUSP14/SPAG9/MAP3K12/PBK/ILK/EPHB2/IGFBP6/PRKCD/RGS3/IQGAP3/CD40/DUSP10/PDGFRB/ROBO1/THBS1/ZEB2/DUSP16/TENM1/MAGED1/HMGR/IL1B/LRRK2/APOE/FZD4/CD74/NEK10/P2RX7/PTPN22/TLR9
GO:0007596	blood coagulation	2,25E-03	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/TRPC3/GATA3/F2RL1/F2R/F2RL2/GAS6/DGKH/P2RX5/GNAS/ZFPM2/LYN/FN1/PROS1/PRKACB/MYL9/SH2B3/UBASH3B/AKAP1/DGKD/MAFG/VCL/EHD1/TYRO3/GNA11/FYN/CAV1/SRC/PLAUR/HMG20B/LMAN1/ANXA2/VKORC1/ILK/CD59/EPHB2/PRCP/PROCR/PRKCD/ITPR2/EHD3/PLAT/CD40/HSPB1/CD9/PLA2G4A/PAPSS2/THBS1/GNG2/HPS5/PRKG1/SERPINA5/APOE/DGKI/P2RX7/ABAT/HGFAC/HBE1
GO:0050817	coagulation	3,10E-03	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/TRPC3/GATA3/F2RL1/F2R/F2RL2/GAS6/DGKH/P2RX5/GNAS/ZFPM2/LYN/FN1/PROS1/PRKACB/MYL9/SH2B3/UBASH3B/AKAP1/DGKD/MAFG/VCL/EHD1/TYRO3/GNA11/FYN/CAV1/SRC/PLAUR/HMG20B/LMAN1/ANXA2/VKORC1/ILK/CD59/EPHB2/PRCP/PROCR/PRKCD/ITPR2/EHD3/PLAT/CD40/HSPB1/CD9/PLA2G4A/PAPSS2/THBS1/GNG2/HPS5/PRKG1/SERPINA5/APOE/DGKI/P2RX7/ABAT/HGFAC/HBE1
GO:0001822	kidney development	2,72E-05	ITGA8/IRX1/PDGFD/PTPRO/TGFB2/GATA3/PROX1/EPHA7/SULF2/SERPINF1/BDNF/EFNB2/GLIS2/GREB1L/ODC1/FOXC2/SMAD1/PLCE1/TIPARP/NOTCH1/GLI2/LAMA5/EPHA4/PPAT/IRX3/BCL2L11/PKD1/KANK2/BCL2/TP73/FGF2/PKD2/FSTL3/NLE1/ITGA3/LIF/FOXC1/GDNF/SMAD3/ILK/MYO1E/LAMB2/MMP17/ADAMTS1/STRA6/CENPF/LGR4/FBN1/ARG2/PDGFRB/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SLIT2/LRRK2/SULF1/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:0140014	mitotic nuclear division	4,77E-04	HECW2/MISP/RB1/HSPA1B/PDXP/XRCC3/PDS5B/HSPA1A/CDC16/LRP5/TGFA/KATNB1/CUL7/CHMP1B/CDKN1B/KIF23/NCAPD2/KIF22/BUB1B/ESPL1/RACGAP1/KIF18B/TPX2/NUSAP1/KIF2A/OBSL1/CDC20/TTK/ANLN/KIF2C/TUBG2/PRC1/NDC80/KIF14/CDC48/UBE2S/KIF4A/CENPF/BIRC5/PSRC1/NUF2/SPAG5/PTTG1/BUB1/NEK2/DLGA5/PDGFRB/CCNB2/CENPE/UBE2C/AURKA/PLK1/CCNB1/CDC25C/IL1B/IL1A
GO:0050890	cognition	1,60E-03	NPTX2/ITGA8/PPP1R1B/NTSR1/RELN/NTRK2/BTG2/SERPINF1/BDNF/MEIS2/ADGRF1/ST3GAL4/CHD7/EIF4EBP2/ITGA3/ADCY3/ATAD1/APP/ARF4/SYT11/PAIP2/FYN/PLK2/PJA2/B2M/MAGT1/GMFB/NTAN1/NPTN/NRGN/EPHB2/SLC1A4/STRA6/MAN2B1/DLGA4/NFATC4/PLCB1/JUN/SHROOM4/SBK1/SLC24A2/MEF2C/DNAH11/HMGR/CHL1/PTN/S100B/TAF2/APOE/PTPRZ1/DGKI/HLA-DRA/CALB1/LHX8/NRXN3/BCHE
GO:0010001	glial cell differentiation	3,11E-06	ROR1/RELN/NTRK2/DLX2/LEF1/TNFRSF21/NOTCH1/LYN/WASF3/GPR157/DICER1/EPHA4/TP73/CDH2/PPARG/PICK1/DLX1/B4GALT5/LIF/METTL3/ABL1/SKI/APP/SOX10/SOD1/BACE2/NFIB/ERBB3/GSN/B4GALT6/ILK/CNP/LAMB2/VIM/CNTNAP1/DUSP10/CD9/MYRF/CDKN2C/NDRG1/BNIP3/SOX6/SOX13/DTX1/PTN/IL1B/S100B/TMEM98/PTPRZ1/LAMA2/PLP1/PPP/KCNJ10/TENM4/DAB1
GO:0045926	negative regulation of growth	3,87E-05	DCC/OSTN/IGFBP5/TGFB2/GDF15/EPHA7/RGS4/SPP1/STC2/RGS2/SEMA3C/MAPK11/NOTCH1/FGFR3/CCN3/WWC1/SESN2/WWC2/RB1/SPART/BCL2/TP73/HSPA1B/PPARG/HSPA1A/CDKN1A/RNF6/CRLF3/SMARCA4/CDKN1B/SEMA7A/NDRG3/BBS2/BTG1/SMAD3/JARID2/SEMA4C/TSPYL2/SEMA4G/TGFB2/MEIS1/SEMA3E/PSRC1/DUSP10/BCL6/CDKN2C/NTN1/SOCS2/MT2A/INHBA/CXADR/SLIT2/MT1X/SEMA3G/BCL11A
GO:0007249	I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	8,09E-04	CD36/ROR1/F2RL1/F2R/LURAP1L/IRAK1BP1/TRIM14/PER1/ROCK2/S100A4/TRIM25/TRAF5/TNFRSF19/PLEKHG5/CXXC5/TNFRSF10B/NDFIP2/IRAK1/AJUBA/TRIM13/TRAF3/USP10/ABL1/ZMYND11/HACD3/SLC20A1/FYN/LITAF/GOLT1B/ZFAND6/PLK2/OTUD7B/OPTN/SLC44A2/RHOC/ALPK1/PINK1/NDFIP1/SECTM1/CD40/HSPB1/TRIM62/TGM2/TRIM22/CAPN3/IL1B/S100B/TRIML2/CD74/UNC5CL/HLA-DRB1/UBD/TRAFF1/CASP1/TLR9

GO:1902105	regulation of leukocyte differentiation	1.10E-03	BGLAP/CEACAM1/IKZF3/GATA3/INPP5D/PPARGC1B/GAS6/ZBTB46/TESC/IL12A/LEF1/CSF1/GNAS/RUNX3/SLC9B2/LYN/GLI2/KLF10/RB1/ZBTB7B/TNFSF9/UBASH3B/IL4R/FANCA/ZFP36L1/FSTL3/LIF/TMEM64/METTL3/ABL1/CUL4A/SOD1/RUNX1/NFKBIZ/FBXO7/TGFB2/NDFIP1/DUSP10/FBN1/EGR3/BCL6/HLA-B/JUN/INHBA/BTN2A2/SOX13/NFATC2/DTX1/IL1B/IL1A/LAG3/CD74/HLA-DRB1/HLA-DOA/TLR9
GO:0044843	cell cycle G1/S phase transition	3.98E-03	BTG2/PLAGL1/E2F7/CYP1A1/CTDSPL/GADD45A/PLK3/KLF4/SLFN11/PPAT/RB1/PKD1/KANK2/BCL2/MCM5/RRM2/MCM6/EZH2/GMNN/E2F1/MCM4/CDC25A/CDKN1A/MDM2/PKD2/SKP2/CRLF3/MCM3/E2F3/RPS6KB1/MCM2/CUL4A/CDKN1B/CNOT7/PLK2/ACVR1/PSME1/FBXO7/ADAMTS1/KIF14/CDK16/IQGAP3/GTSE1/CDKN3/DACT1/FAM83D/CCL2/CDKN2C/PLCB1/CDK18/AURKA/CCNB1/INHBA/BTN2A2/CDC25C
GO:0000082	G1/S transition of mitotic cell cycle	1.50E-03	BTG2/PLAGL1/E2F7/CYP1A1/CTDSPL/GADD45A/PLK3/KLF4/SLFN11/PPAT/RB1/PKD1/KANK2/BCL2/MCM5/RRM2/MCM6/EZH2/GMNN/E2F1/MCM4/CDC25A/CDKN1A/MDM2/PKD2/SKP2/CRLF3/MCM3/E2F3/RPS6KB1/MCM2/CUL4A/CDKN1B/CNOT7/PLK2/ACVR1/PSME1/FBXO7/ADAMTS1/KIF14/CDK16/IQGAP3/GTSE1/CDKN3/DACT1/CCL2/CDKN2C/PLCB1/CDK18/AURKA/CCNB1/INHBA/BTN2A2/CDC25C
GO:0051348	negative regulation of transferase activity	2.71E-03	PPP1R1B/PTPRO/CEACAM1/SORL1/RGS4/RGS2/TESC/LYN/GADD45A/PPM1E/TRIB3/RB1/SPRED3/SH2B3/UBASH3B/PPARG/ERRF1/ITPRIP/CDKN1A/LRP5/DUSP3/AJUBA/DUSP4/CHORDC1/ABL1/IPO5/SPRED1/CDKN1B/KAT2B/CAV1/SRC/HEXIM1/DUSP14/ILK/GMFB/EPHB2/FBXO7/SOCS3/PRKCD/CBLB/RGS3/CORO1C/DUSP10/HSPB1/CDKN2C/DBNDD1/PIF1/DUSP16/PLK1/SLC8A1/HMGCR/IL1B/APOE/PTPN22
GO:0007162	negative regulation of cell adhesion	3.65E-03	SERPINE1/PTPRO/CEACAM1/APOD/TGFB1/RIPOR2/AKNA/PLXND1/TNFRSF21/SPOCK1/RUNX3/NOTCH1/KLF4/ZBTB7B/SH2B3/UBASH3B/IL4R/PAWR/PLXNB2/PLXNA1/DUSP3/METTL3/ABL1/MAP4K4/PLXNB1/SRC/RUNX1/FXYD5/ERBB3/ADAM10/BCAS3/PLXNB3/PRKCD/CORO1C/SEMA3E/NDFIP1/LPXN/KANK1/CD9/FZD7/ARG2/BCL6/THBS1/TRPV4/PRKG1/BTN2A2/DTX1/FZD4/LAG3/CD74/HLA-DRB1/ABAT/PTPN22/DAB1
GO:0043122	regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	2.53E-04	CD36/ROR1/F2RL1/F2R/LURAP1L/TRIM14/PER1/S100A4/TRIM25/TRAF5/TNFRSF19/PLEKHG5/CXXC5/TNFRSF10B/NDFIP2/IRAK1/AJUBA/TRIM13/TRAF3/USP10/ABL1/ZMYND11/SLC20A1/FYN/LITAF/GOLT1B/ZFAND6/PLK2/OTUD7B/OPTN/SLC44A2/RHOC/ALPK1/PINK1/NDFIP1/SECTM1/CD40/HSPB1/TRIM62/TGM2/TRIM22/CAPN3/IL1B/S100B/TRIML2/CD74/UNC5CL/HLA-DRB1/UBD/TRAF1/CASP1/TLR9
GO:0021700	developmental maturation	3.71E-03	TGFB2/RELN/GATA3/UNC13A/XYLTI1/L3MBTL3/NTN4/FZD5/FERMT1/PLD6/NEFL/FGFR3/FAM210B/RB1/BCL2/PPARG/PICK1/ZBTB7A/CDKN1A/DDIT3/B4GALT5/ANKRD27/APP/SOX10/IIFT80/CLSTN1/PLXNB1/AP1M1/SLC26A6/CD63/B4GALT6/NR4A2/CDC20/KIF14/C3/DLG4/NFATC4/BFSP1/PDE3A/MMP2/AURKA/CCNB1/KLF2/LRRK2/FAM20C/NRCAM/NFASC/ANG/BCL11A/S1PR1/ROPN1B/NPPC
GO:0060485	mesenchyme development	4.48E-03	EPHA3/TGFB2/GATA3/EDNRA/AKNA/IL17RD/SEMA3C/LEF1/FOXC2/ZFPM2/NOTCH1/FN1/KBTBD8/LAMA5/PHLDB1/SPRED3/BCL2/S100A4/EZH2/HMGA2/ZFP36L1/MDM2/PKD2/FOXC1/NOLC1/CUL7/SPRED1/ANXA6/SOX10/GDNF/SEMA7A/ACVR1/SMAD3/ERBB3/SEMA4C/CRELD1/SEMA4G/TGFB2/CORO1C/SEMA3E/CITED2/LOXL2/FAM83D/TRIM62/PDGFRB/ROBO1/ZEB2/MEF2C/BAMBI/HEY2/IL1B/SEMA3G
GO:0001763	morphogenesis of a branching structure	1.86E-06	AREG/PROX1/EDNRA/EPHA7/AR/NTN4/DLX2/PLXND1/FZD5/CTSZ/SEMA3C/LEF1/CSF1/HOXD13/GREB1/FOXC2/NOTCH1/GLI2/LAMA5/PKD1/BCL2/COL4A1/FGF2/EPHA2/LRP5/PLXNA1/PKD2/DDR1/ABL1/SOX10/KDM5B/GDNF/SRC/ACVR1/ILK/SOCS3/TGFB2/SEMA3E/LGR4/NFATC4/LAMA1/MAGED1/TGM2/WNT2B/SLIT2/LRRK2/SULF1/CITED1/KDR/BCL11A/HHIP
GO:0016358	dendrite development	2.82E-04	DCC/DCLK1/HECW2/RELN/BDNF/GRIP1/MARK1/EPHA4/TRAK1/FBXW8/PPP1R9A/KIF1A/EZH2/EEF2K/PDLIM5/RBFOX2/ANKRD27/SS18L1/CUL7/LRP8/APP/ARF4/FYN/BTBD3/VAMP7/PLK2/ADAM10/DBN1/ILK/OBSL1/CDC20/COBL/ID1/EPHB2/EPHB3/PREX1/LZTS3/ZMYND8/TANC2/DLG4/NFATC4/NTN1/PRKG1/MEF2C/EPHB1/PTN/LRRK2/APOE/MATN2/BCL11A/DAB1
GO:0061448	connective tissue development	1.08E-03	PDGFD/SORL1/PRRX1/TGFB1/SULF2/DLX2/PTH1H/CSF1/CCN2/FOXC2/GNAS/SMAD1/RUNX3/NOTCH1/FGFR3/CCN3/COL5A1/GLI2/STC1/CHST11/SPART/PKD1/FGF2/HMGA2/SLC25A25/LRP5/ANXA6/IIFT80/RUNX1/BBS2/NFIB/SMAD3/BGN/COL27A1/ARRDC3/TGFB2/PLAAT3/HOXA3/RARG/LOXL2/PDGFRB/ITGB8/TRPV4/SOX6/MEF2C/WNT2B/SULF1/COL11A1/NPPC/ACAN/MAF
GO:0033673	negative regulation of kinase activity	1.70E-03	PPP1R1B/PTPRO/CEACAM1/SORL1/RGS4/RGS2/TESC/LYN/GADD45A/PPM1E/TRIB3/RB1/SPRED3/SH2B3/UBASH3B/ERRF1/ITPRIP/CDKN1A/LRP5/DUSP3/AJUBA/DUSP4/CHORDC1/ABL1/IPO5/SPRED1/CDKN1B/KAT2B/CAV1/HEXIM1/DUSP14/ILK/GMFB/EPHB2/FBXO7/SOCS3/PRKCD/CBLB/RGS3/CORO1C/DUSP10/HSPB1/CDKN2C/DBNDD1/DUSP16/PLK1/SLC8A1/HMGCR/IL1B/APOE/PTPN22
GO:0098742	cell-cell adhesion via plasma-membrane adhesion molecules	3.08E-03	UNC5D/PCDH7/CEACAM1/TGFB2/PCDHA12/IGFN1/ADGRL3/TENM2/PCDHGB1/PALLD/FGFRL1/NECTIN4/AMIGO2/KLF4/PCDHB15/PVR/PCDHGA10/PKD1/CDH2/PCDHGA7/PLXNB2/AJUBA/ALCAM/CLSTN1/ACVR1/FXYD5/OBSL1/PLXNB3/NPTN/GPC6/TGFB2/PTPRM/DSC3/PCDH1/CDH19/CADM1/ROBO1/TRO/PCDHGB5/TENM1/CLDN1/ROBO4/CXADR/MDGA1/MPZ/HMCN1/NTNG2/CADM3/FAT3/TENM4/DAB1
GO:0045665	negative regulation of neuron differentiation	5.45E-05	DCC/OSTN/PTPRO/EPHA7/SPP1/DLX2/CTSZ/EFNB2/SEMA3C/NR2F1/SPOCK1/NOTCH1/EPHA4/IRX3/SPART/TP73/DLX1/DPYSL3/MDM2/RAP1GAP2/RNF6/GAK/APP/CALR/PLK2/SEMA7A/ITM2C/B2M/SEMA4C/ID1/EPHB2/SEMA4G/ASPM/VIM/MEIS1/SEMA3E/KANK1/NFATC4/EFNB3/NTN1/TRPV4/NGFR/SLIT2/DTX1/CRMP1/LRRK2/SEMA3G/APOE/BCL11A/DAB1
GO:0006469	negative regulation of protein kinase activity	5.03E-04	PPP1R1B/PTPRO/CEACAM1/SORL1/RGS4/RGS2/TESC/LYN/GADD45A/PPM1E/TRIB3/RB1/SPRED3/SH2B3/UBASH3B/ERRF1/ITPRIP/CDKN1A/LRP5/DUSP3/AJUBA/DUSP4/CHORDC1/ABL1/IPO5/SPRED1/CDKN1B/KAT2B/CAV1/HEXIM1/DUSP14/ILK/GMFB/EPHB2/FBXO7/SOCS3/PRKCD/CBLB/RGS3/CORO1C/DUSP10/HSPB1/CDKN2C/DBNDD1/DUSP16/PLK1/SLC8A1/HMGCR/IL1B/APOE/PTPN22
GO:0033157	regulation of intracellular protein transport	2.13E-03	CD36/APOD/SORL1/GAS6/FZD5/FERMT1/PMAIP1/PLK3/XPO4/B3GAT3/BCL2/TP73/USP36/E2F1/PIK3R2/MDM2/UFM1/SAE1/NOLC1/XPO5/IPO5/LEPROT/TCAF1/EMD/TMEM30A/FYN/YWHAQ/MFF/VAMP7/ERLEC1/SMAD3/LMAN1/SUFU/BCAS3/TOMM7/BNIP3L/CEMIP/PRKCD/PINK1/INSIG1/NUP58/GTSE1/TAMALIN/TENM1/JUP/TCAF2/IL1B/LRRK2/ANK3/RAC2
GO:0019882	antigen processing and presentation	2.53E-04	CD36/SPTBN2/ABCB9/DYNC1L2/CALR/SEC13/KIF23/PSMA2/ACTR10/PSMB2/KIF22/AP1M1/RACGAP1/PSMA7/B2M/PSMB4/KOLC1/XPO5/IPO5/LEPROT/TCAF1/EMD/TMEM30A/FYN/YWHAQ/MFF/VAMP7/ERLEC1/SMAD3/LMAN1/SUFU/BCAS3/TOMM7/BNIP3L/CEMIP/PRKCD/PINK1/INSIG1/NUP58/GTSE1/TAMALIN/TENM1/JUP/TCAF2/IL1B/LRRK2/ANK3/RAC2
GO:0007611	learning or memory	2.61E-03	NPTX2/ITGA8/PPP1R1B/NTSR1/RELN/NTRK2/BTG2/SERPINF1/BDNF/MEIS2/ADGRF1/EIF4EBP2/ITGA3/ADCY3/ATAD1/APP/ARF4/SYT11/PAIP2/FYN/PLK2/PJA2/B2M/GMFB/NTAN1/NPTN/NRGN/EPHB2/ST

			RA6/MAN2B1/DLG4/NFATC4/PLCB1/JUN/SGK1/SLC24A2/MEF2C/DNAH11/HMGCR/PTN/S100B/TAF2/APOE/PTPRZ1/DGK1/CALB1/LHX8/NRXN3/BCHE
GO:0070085	glycosylation	3.53E-03	MUC5AC/MUC15/B3GALT1/FUT9/MGAT4C/GALNT13/ST8SIA4/B4GALNT1/GALNT10/B3GNT5/B3GLCT/MVD/B3GAT3/TRAK1/EXT1/GFPT1/ALG11/ST3GAL3/ST3GAL4/SLC35C1/SLC39A8/B4GALT5/B4GALT1/PIGM/DPM2/NUS1/TMTC2/MPI/MAN2A2/LMAN1/B4GALT6/FUT8/GXYLT1/MAGT1/OSTC/ST3GAL5/PMM1/B3GAT1/ST6GAL1/GXYLT2/GBGT1/EXTL1/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/ASGR1/GALNT18/LARGE1
GO:0051091	positive regulation of DNA-binding transcription factor activity	4.94E-03	CD36/ROR1/RELN/PPARGC1B/AR/ZIC2/ADGRF1/DDR2/DDX58/TRIM14/HSPA1B/TRIM25/TRAF5/PPARG/HSPA1A/ZBTB7A/DHX33/LRP5/CEBPG/IRAK1/TRIM37/DDIT3/PPRC1/TRIM13/CRTC3/ARHGFE2/SMARCA4/LRP8/APP/CAV1/SMAD3/RWDD1/FLOT1/PINK1/CD40/FZD1/TRIM62/AIM2/JUP/OPRD1/TRIM22/CAPN3/IL1B/FZD4/TRIML2/RAB7B/CD200/TRAF1/TLR9
GO:0031345	negative regulation of cell projection organization	3.11E-06	DCC/OSTN/PTPRO/EPHA7/TBC1D30/SPP1/CTSZ/EFNB2/SEMA3C/NR2F1/SPOCK1/EPHA4/CCP110/EV15L/SPART/DPYSL3/MDM2/RAP1GAP2/RNF6/ITGA3/GAK/FYN/PLK2/SEMA7A/ITM2C/B2M/SEMA4C/ID1/PLXNB3/EPHB2/SEMA4G/PRKCD/VIM/SEMA3E/KANK1/NFATC4/EFNB3/NTN1/TRPV4/NGFR/ARHGA P24/SLIT2/CRMP1/LRRK2/SEMA3G/APOE/BCL11A/DAB1
GO:0000302	response to reactive oxygen species	6.31E-04	CD36/AREG/PDGFD/APOD/PPARGC1B/TXNIP/GCH1/SIGMAR1/PLK3/CAMKK2/SES2/KLF4/BCL2/SESN1/EZH2/PAWR/ETS1/KDM6B/MDM2/PKD2/GLRX2/PYCR1/ABL1/NQO1/FYN/SOD1/SRC/EGLN1/STAT6/RHOB/PRKCD/PINK1/LDHA/PLEKHA1/PDGFRB/MMP2/JUN/BNIP3/CYP2E1/SLC8A1/KLF2/SESN3/SOD2/LRRK2/APOE/GPR37/LCN2/FBLN5
GO:0060560	developmental growth involved in morphogenesis	6.57E-04	DCC/OSTN/DCLK1/AREG/UNC13A/EPHA7/SPP1/BDNF/SEMA3C/CSF1/HOXD13/NOTCH1/FN1/SPART/MACF1/PLXNA1/RNF6/VCL/DDR1/RNF157/ABL1/WDR36/APP/ALCAM/KDM5B/SEMA7A/DPYSL2/DBN1/SEMA4C/ILK/COBL/LAMB2/SEMA4G/TGFBR2/SEMA3E/RARG/NTN1/ZEB2/SHTN1/AURKA/SLIT2/SEMA3G/APOE/NRCAM/BCL11A/S1PR1/CACNG7/RASAL1
GO:0061138	morphogenesis of a branching epithelium	6.84E-06	AREG/PROX1/EDNRA/AR/NTN4/PLXND1/FZD5/CTSZ/SEMA3C/LEF1/CSF1/HOXD13/GREB1/FOXC2/NOTCH1/GLI2/LAMA5/PKD1/BCL2/COL4A1/FGF2/EPHA2/LRP5/PLXNA1/PKD2/DDR1/ABL1/SOX10/KDM5B/GDNF/SRC/ACVR1/ILK/SOCS3/TGFBR2/SEMA3E/LGR4/NFATC4/LAMA1/MAGED1/TGM2/WNT2B/SLIT2/SULF1/CITED1/KDR/HHIP
GO:0050807	regulation of synapse organization	6.48E-04	PTPRO/RELN/EPHA7/NTRK2/ADGRL3/BDNF/AMIGO2/EPHA4/PPP1R9A/KIF1A/CDH2/EEF2K/PDLIM5/ABL1/LRP8/SPARC/APP/ARF4/FYN/CLSTN1/TUBB/ADAM10/DBN1/NLGN2/EGLN1/CDC20/EPHB2/GPC6/EPHB3/LZTS3/ZMYND8/TANC2/FZD1/NFATC4/ABHD17C/NTN1/MEF2C/EPHB1/MDGA1/PTN/TUBA1A/LRRK2/THBS2/APOE/NRCAM/NTNG2/SRGN
GO:0001649	osteoblast differentiation	7.67E-04	OSTN/IGFBP5/AREG/BGLAP/VCAN/RORB/LRP3/SPP1/PTHLH/LEF1/IFITM1/GNAS/DDR2/SMAD1/COL6A1/NOTCH1/SMOC1/GLI2/FASN/JUNB/EPHA2/LRP5/TMEM64/IARS1/SKI/NBR1/IFT80/SND1/SEMA7A/ACVR1/SMAD3/TOB1/SUFU/ILK/IGFBP3/ID1/MRC2/CTHRC1/LGR4/FZD1/CEBPD/TP53INP2/MEF2C/FAM20C/CITED1/ALPL/NPPC
GO:0050803	regulation of synapse structure or activity	1.64E-03	PTPRO/RELN/EPHA7/NTRK2/ADGRL3/BDNF/AMIGO2/EPHA4/PPP1R9A/KIF1A/CDH2/EEF2K/PDLIM5/ABL1/LRP8/SPARC/APP/ARF4/FYN/CLSTN1/TUBB/ADAM10/DBN1/NLGN2/EGLN1/CDC20/EPHB2/GPC6/EPHB3/LZTS3/ZMYND8/TANC2/FZD1/NFATC4/ABHD17C/NTN1/MEF2C/EPHB1/MDGA1/PTN/TUBA1A/LRRK2/THBS2/APOE/NRCAM/NTNG2/SRGN
GO:0033002	muscle cell proliferation	2.25E-03	MEGF10/IGFBP5/PDGFD/APOD/TGFBR2/IL12A/FOXC2/MAPK11/SMAD1/ZFPM2/NOTCH1/CCN3/ABCC4/KLF4/TP73/FGF2/PPARG/CDKN1A/IRAK1/MDM2/SKP2/FOXC1/CDKN1B/JARID2/ILK/IGFBP3/ADAMTS1/TGFBR2/MEIS1/SIX5/PDGFRB/MMP2/THBS1/JUN/PRKG1/CCNB1/TGM2/MEF2C/CXADR/EPHB1/HMGCR/HEY2/SOD2/ANG/S1PR1/NPPC/TENM4
GO:0006486	protein glycosylation	3.72E-03	MUC5AC/MUC15/B3GALT1/FUT9/MGAT4C/GALNT13/ST8SIA4/GALNT10/B3GNT5/B3GLCT/MVD/B3GAT3/TRAK1/EXT1/GFPT1/ALG11/ST3GAL3/ST3GAL4/SLC35C1/SLC39A8/B4GALT5/B4GALT1/DPM2/NUS1/TMTC2/MPI/MAN2A2/LMAN1/B4GALT6/FUT8/GXYLT1/MAGT1/OSTC/ST3GAL5/PMM1/B3GAT1/ST6GAL1/GXYLT2/GBGT1/EXTL1/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/ASGR1/GALNT18/LARGE1
GO:0043413	macromolecule glycosylation	3.72E-03	MUC5AC/MUC15/B3GALT1/FUT9/MGAT4C/GALNT13/ST8SIA4/GALNT10/B3GNT5/B3GLCT/MVD/B3GAT3/TRAK1/EXT1/GFPT1/ALG11/ST3GAL3/ST3GAL4/SLC35C1/SLC39A8/B4GALT5/B4GALT1/DPM2/NUS1/TMTC2/MPI/MAN2A2/LMAN1/B4GALT6/FUT8/GXYLT1/MAGT1/OSTC/ST3GAL5/PMM1/B3GAT1/ST6GAL1/GXYLT2/GBGT1/EXTL1/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/ASGR1/GALNT18/LARGE1
GO:0048002	antigen processing and presentation of peptide antigen	2.70E-05	CD36/SPTBN2/ABCY9/DYNC1L2/CALR/SEC13/KIF23/PSMA2/ACTR10/PSMB2/KIF22/AP1M1/RACGAP1/PSMA7/B2M/PSMB4/KIF2A/PSME1/KIF2C/SNAP23/CTS/IF4A/SEC24D/HLA-A/IFI30/HLA-C/CTSS/CENPE/HLA-E/HLA-B/AZGP1/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0048588	developmental cell growth	2.25E-03	DCC/OSTN/DCLK1/UNC13A/EPHA7/RGS4/SPP1/RGS2/BDNF/SEMA3C/FN1/SPART/SORBS2/MACF1/PLXNA1/RNF6/PDLIM5/VCL/DDR1/RNF157/ABL1/WDR36/APP/ALCAM/SEMA7A/DPYSL2/DBN1/SEMA4C/ILK/COBL/LAMB2/SEMA4G/TGFBR2/SEMA3E/RARG/NTN1/ZEB2/SHTN1/AURKA/SLIT2/SEMA3G/APOE/NRCAM/BCL11A/CACNG7/RASAL1
GO:0051402	neuron apoptotic process	3.72E-03	ITGA1/TGFBR2/GATA3/EPHA7/NTRK2/F2R/BTG2/BDNF/CTS/NEFL/TNFRSF21/SIGMAR1/BCL2L11/RB1/BCL2/KDM2B/DLX1/LIG4/DDIT3/TYRO3/APP/NQO1/FYN/SOD1/GDNF/ERBB3/MAP3K12/NR4A2/ILK/GAPDH/KIF14/USP53/PINK1/NFATC4/CCL2/JUN/GRIK2/BNIP3/NGFR/MEF2C/CHL1/SOD2/APOE/PTPRZ1/CITED1/TFAP2B
GO:0050770	regulation of axonogenesis	2.09E-05	DCC/PTPRO/EPHA7/NTRK2/SPP1/BDNF/PLXND1/SEMA3C/NEFL/MYCBP2/FN1/EPHA4/SPART/TRAK1/CDH2/MACF1/PLXNB2/PLXNA1/RNF6/ABL1/WDR36/PLXNB1/SEMA7A/DPYSL2/DBN1/SEMA4C/ILK/PLXNB3/EPHB2/SEMA4G/EPHB3/SEMA3E/CHN1/TIAM2/EFNB3/ROBO1/NTN1/ZEB2/SHTN1/NGFR/SLIT2/SEMA3G/APOE/NRCAM/DAB1
GO:0002478	antigen processing and presentation of exogenous peptide antigen	1.53E-05	CD36/SPTBN2/DYNC1L2/CALR/SEC13/KIF23/PSMA2/ACTR10/PSMB2/KIF22/AP1M1/RACGAP1/PSMA7/B2M/PSMB4/KIF2A/PSME1/KIF2C/SNAP23/CTS/IF4A/SEC24D/HLA-A/IFI30/HLA-C/CTSS/CENPE/HLA-E/HLA-B/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0019884	antigen processing and presentation of	3.87E-05	CD36/SPTBN2/DYNC1L2/CALR/SEC13/KIF23/PSMA2/ACTR10/PSMB2/KIF22/AP1M1/RACGAP1/PSMA7/B2M/PSMB4/KIF2A/PSME1/KIF2C/SNAP23/CTS/IF4A/SEC24D/HLA-A/IFI30/HLA-C/CTSS/CENPE/HLA-E/HLA-B/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2

	exogenous antigen		
GO:1901888	regulation of cell junction assembly	2,53E-04	EPHA3/APOD/EPHA7/NTRK2/ADGRL3/BDNF/FZD5/AMIGO2/ROCK2/PPP1R9A/MACF1/EEF2K/EPHA2/PDLIM5/DUSP3/VCL/ABL1/APP/MAP4K4/CAV1/CLSTN1/SRC/RUNX1/SMAD3/NLGN2/BCAS3/EPHB2/LOT1/GPC6/EPHB3/CORO1C/FZD1/NTN1/THBS1/CLDN1/MEF2C/EPHB1/MDGA1/COL16A1/IL1B/THBS2/KDR/NTNG2/GPM6B
GO:0034341	response to interferon-gamma	3,05E-04	IFITM2/DAPK1/GCH1/IFITM1/TRIM25/PPARG/CAMK2D/PARP14/SLC26A6/GSN/B2M/GAPDH/SOCS3/PKCD/VIM/HLA-A/IFNGR2/IFI30/CD40/HLA-C/CCL2/TRIM62/GBP2/HLA-E/HLA-B/IRF5/MT2A/CLDN1/TRIM22/CIITA/HLA-DPA1/HLA-DPB1/CITED1/HLA-DRA/RAB7B/NCAM1/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/UBD/CASP1/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0007160	cell-matrix adhesion	3,53E-03	CD36/ITGA8/SERPINE1/FREM1/ITGA1/EPHA3/APOD/FERMT1/CSF1/CCN2/FN1/BCL2L11/ROCK2/PKD1/BCL2/MACF1/DUSP3/AJUBA/VCL/ITGA3/DDR1/ITGB4/ABL1/PIP5K1A/MAP4K4/SRC/SMAD3/CD63/ILK/BCAS3/SGCE/CORO1C/SEMA3E/BCAM/BCL6/THBS1/JUP/NID2/SORBS1/ITGA7/COL16A1/KDR/GPM6B/FBLN5
GO:0098657	import into cell	3,53E-03	CD36/NTSR1/HCN2/RGS4/SLC6A20/RGS2/EFNB2/SLC7A2/SLC47A1/SLC7A1/SLC19A1/KCNJ2/SLC43A1/SLC29A2/SLC12A4/SLC46A1/SLC29A1/SLC39A8/ATAD1/RPS6KB1/SLC5A6/FYN/GDNF/SLC12A2/SLC12A7/ARL6IP1/SLC2A3/SLC9A7/FLOT1/SLC1A4/NUMB/WNK4/THBS1/SLC5A3/RAB3B/TRPV4/TRPV1/SLC24A2/SLC9A5/SLC8A1/GPM6B/KCNJ8/KCNJ10/CACNG7
GO:1903708	positive regulation of hemopoiesis	7,45E-04	GATA3/INPP5D/PPARGC1B/GAS6/ZBTB46/TESC/IL12A/LEF1/CSF1/GNAS/RUNX3/SLC9B2/GLI2/KLF10/FAM210B/RB1/ZBTB7B/TNFSF9/HSPA1B/N4BP2L2/HSPA1A/IL4R/ETS1/ZFP36L1/LIF/FOXC1/TMEM64/RUNX1/NFKBIZ/TGFB2/DUSP10/EGR3/BCL6/FAXDC2/JUN/INHBA/BTN2A2/SOX13/IL1B/IL1A/CD74/RAB7B/HLA-DRB1
GO:0002573	myeloid leukocyte differentiation	1,29E-03	BGLAP/CEACAM1/GATA3/F2RL1/INPP5D/PPARGC1B/L3MBTL3/ZBTB46/TESC/LEF1/CSF1/GNAS/SLC9B2/LYN/FASN/KLF10/JUNB/RB1/UBASH3B/PPARG/EPHA2/ZFP36L1/IFI16/FSTL3/LIF/TMEM64/CUL4A/APP/SRC/LBR/RUNX1/ANXA2/TGFB2/NDFIP1/FBN1/JUN/INHBA/IL31RA/MEF2C/FAM20C/CD74/HLA-DRB1/UBD
GO:0030278	regulation of ossification	1,53E-03	OSTN/IGFBP5/AREG/BGLAP/TGFB2/RORB/LRP3/CSF1/IFITM1/GNAS/DDR2/SMAD1/NOTCH1/SMOC1/SGMS2/BCL2/ATP2B1/LRP5/TMEM64/SKI/TXLNG/NBR1/ACVR1/SMAD3/TOB1/SUFU/ILK/ID1/CTHRC1/CEBPD/ANKH/MEF2C/SLC8A1/PTN/TPH1/DHRS3/FAM20C/CITED1/SRGN/GPM6B/S1PR1/P2RX7/NPPC
GO:0010810	regulation of cell-substrate adhesion	2,29E-03	CD36/SERPINE1/PTPRO/EPHA3/APOD/FERMT1/CSF1/SPOCK1/NOTCH1/FN1/ROCK2/BCL2/MACF1/TRIOBP/DUSP3/VCL/ITGA3/DDR1/ABL1/CALR/MAP4K4/SRC/P4HB/SMAD3/ILK/BCAS3/CORO1C/SEMA3E/PREX1/KANK1/FZD7/BCL6/THBS1/JUP/CCDC80/UNC13D/PTN/COL16A1/ABI3BP/FZD4/KDR/GPM6B/RAC2
GO:0007051	spindle organization	1,60E-04	MISP/TRIM36/CEP126/GOLGA8B/PKD1/AUNIP/HSPA1B/GNAI1/HSPA1A/SEN6/TUBGCP3/CHMP1B/KIF23/NEK7/TUBB/PLK2/ESPL1/PTPA/SUN2/RACGAP1/TPX2/STMN1/KIF2A/CDC20/TTK/TUBG2/HAUS4/PRC1/NDC80/ASPM/KIF4A/BIRC5/PSRC1/NUF2/SPAG5/NEK2/DLGAP5/CENPE/AURKA/PLK1/CCNB1/TPPP
GO:0043123	positive regulation of I-kappaB kinase/NF-kappaB signaling	2,69E-04	CD36/ROR1/F2RL1/F2R/LURAP1L/TRIM14/S100A4/TRIM25/TRAF5/TNFRSF19/PLEKHG5/CXXC5/TNFRSF10B/NDFIP2/IRAK1/AJUBA/TRIM13/ABL1/SLC20A1/FYN/LITAF/GOLT1B/PLK2/SLC44A2/RHOC/ALPK1/PINK1/NDFIP1/SECTM1/CD40/TRIM62/TGM2/TRIM22/IL1B/S100B/TRIML2/CD74/UNC5CL/HLA-DRB1/UBD/CASP1/TLR9
GO:0045216	cell-cell junction organization	2,25E-03	PTPRO/GJB2/TGFB2/F2RL1/PLEKHA7/F2R/SVEP1/FZD5/NECTIN4/EFNB2/EPHA4/TLN2/PVR/ANK2/ROCK2/CDH2/EPHA2/VCL/CAV1/SRC/RUNX1/SMAD3/ADAM10/NLGN2/RHOC/DSP/CNTNAP1/NUMB/RAB13/CD9/CDH19/CADM1/UGT8/TRPV4/JUP/CLDN1/CXADR/IL1B/NFASC/ANG/CADM3/GJA5
GO:0010977	negative regulation of neuron projection development	1,53E-05	DCC/OSTN/PTPRO/EPHA7/SPP1/CTS2/EFNB2/SEMA3C/NR2F1/SPOCK1/EPHA4/SPART/DPYSL3/MDM2/RAP1GAP2/RNF6/GAK/PLK2/SEMA7A/ITM2C/B2M/SEMA4C/ID1/EPHB2/SEMA4G/VIM/SEMA3E/KANK1/NFATC4/EFNB3/NTN1/TRPV4/NGFR/SLIT2/CRMP1/LRRK2/SEMA3G/APOE/BCL11A/DAB1
GO:0035265	organ growth	1,40E-03	OSTN/TGFB2/PROX1/RGS4/AR/RGS2/FOXC2/MAPK1/DDR2/SMAD1/ZFPM2/NOTCH1/FGFR3/STC1/WWC1/WWC2/BCL2L11/BCL2/TP73/FGF2/SORBS2/PDLIM5/FOXC1/ANXA6/IFT80/SOD1/JARID2/COL27A1/TGFB2/MEIS1/RARG/PDGFRB/CCNB1/MEF2C/CXADR/HEY2/S1PR1/FBLN5/NPPC/TENM4
GO:0051216	cartilage development	3,82E-03	PRRX1/TGFB1/SULF2/DLX2/PTHLH/CCN2/GNAS/SMAD1/RUNX3/FGFR3/CCN3/GLI2/STC1/CHST11/PKD1/FGF2/HMGA2/ANXA6/IFT80/RUNX1/BBS2/NFIB/SMAD3/BGN/COL27A1/TGFB2/HOXA3/RARG/LOXL2/ITGB8/TRPV4/SOX6/MEF2C/WNT2B/SULF1/COL11A1/NPPC/ACAN/MAF
GO:1901654	response to ketone	4,94E-03	PLN/BGLAP/GJB2/TGFB2/SPP1/AR/SERPINF1/TXNIP/NEFL/HOXD13/ACACA/KLF4/AHR/ROCK2/GNAI1/PPARG/ERRFI1/ATP2B1/CDKN1A/CAD/PCK2/ADCY3/CALR/SOX10/WBP2/CAV1/SRC/RWDD1/FBXO32/FOSB/KLF9/THBS1/GNG2/CLDN1/SLIT2/PTN/KLF2/ABCB4/MAOB
GO:0071346	cellular response to interferon-gamma	2,06E-03	DAPK1/TRIM25/PPARG/CAMK2D/PARP14/SLC26A6/GSN/B2M/GAPDH/SOCS3/PRKCD/VIM/HLA-A/IFNGR2/IFI30/HLA-C/CCL2/TRIM62/GBP2/HLA-E/HLA-B/IRF5/MT2A/CLDN1/TRIM22/CIITA/HLA-DPA1/HLA-DPB1/HLA-DRA/RAB7B/NCAM1/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/CASP1/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0051783	regulation of nuclear division	3,25E-03	HECW2/RB1/HSPA1B/PDXP/XRCC3/HSPA1A/CDC16/LRP5/TGFA/LIF/CUL7/CALR/CHMP1B/CDKN1B/UBI1B/ESPL1/NUSAP1/OBSL1/CDC20/TTK/ANLN/NDC80/CENPF/PTTG1/BUB1/NEK2/DLGAP5/PDGFRB/PDE3A/CENPE/PLCB1/UBE2C/AURKA/PLK1/CCNB1/CDC25C/IL1B/IL1A
GO:0048754	branching morphogenesis of an epithelial tube	2,27E-04	AREG/EDNRA/AR/PLXND1/CTS2/LEF1/CSF1/GREB1L/FOXC2/NOTCH1/GLI2/LAMA5/PKD1/BCL2/COL4A1/FGF2/EPHA2/LRP5/PKD2/DDR1/ABL1/KDM5B/GDNF/SRC/ACVR1/ILK/TGFB2/SEMA3E/LGR4/NFATC4/LAMA1/MAGED1/WNT2B/SLIT2/CITED1/KDR/HHIP
GO:0010770	positive regulation of cell morphogenesis involved in differentiation	2,73E-04	RELN/NTRK2/BDNF/PLXND1/NEFL/FN1/EPHA4/TRAK1/FBXW8/MACF1/EEF2K/PLXNB2/TRIOBP/PLXNA1/ANKRD27/SS18L1/CUL7/ABL1/LRP8/CALR/PLXNB1/VAMP7/SEMA7A/P4HB/DBN1/ILK/OBSL1/PLXNB3/PREX1/TIAM2/ROBO1/NTN1/ZEB2/SHTN1/NGFR/SLIT2/UNC13D

GO:0000910	cytokinesis	1,50E-03	SPIRE2/E2F7/TRIM36/CENPV/PLK3/CCP110/ROCK2/PDXP/FMN2/MYO19/PRPF40A/GIT1/ENTR1/CUL7/CHMP1B/SVIL/KLHL21/KIF23/PLK2/ESPL1/RACGAP1/NUSAP1/STMN1/ANLN/RHOC/RTKN/PRC1/SNX33/RHOB/KIF14/KIF4A/CENPA/AURKA/PLK1/KIF20A/ANK3/ROPN1B
GO:0099173	postsynapse organization	1,62E-03	RELN/EPHA7/NOS1AP/NEFL/SPTBN2/EPHA4/PPP1R9A/KIF1A/CDH2/PICK1/EEF2K/PDLIM5/ITGA3/LRP8/ARF4/FYN/GDNF/ADAM10/DBN1/NLGN2/EGLN1/EPHB2/EPHB3/DLG3/LZTS3/ZMYND8/TANC2/DLG4/ABHD17C/NDRG1/EPHB1/PTN/LRRK2/APOE/NRCAM/NTNG2/SRGN
GO:0048771	tissue remodeling	2,55E-03	IGFBP5/BGLAP/CEACAM1/INPP5D/PPARGC1B/F2R/SPP1/SEMA3C/FOXC2/DDR2/ROCK2/UBASH3B/CDH7/EPHA2/LRP5/MDM2/LIF/FOXC1/NCDN/TMEM64/CAV1/SRC/TPP1/BGN/CTHRC1/HOXA3/LGR4/MP2/TGM2/MEF2C/PTN/TPH1/IL1A/S1PR1/P2RX7/RAC2/GJA5
GO:1903034	regulation of response to wounding	3,71E-03	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1/F2R/SPP1/SYTL4/FOXC2/LYN/PROS1/KLF4/EPHA4/SH2B3/UBASH3B/FGF2/CAV1/SLC12A2/SMAD3/PLAUR/ANXA2/VKORC1/EPHB2/PRKCD/PLAT/KANK1/DUSP10/CD9/PLA2G4A/THBS1/PRKG1/CLDN1/HMGCR/PTN/APOE/ABAT/DUOX2
GO:0000070	mitotic sister chromatid segregation	8,96E-04	HECW2/RB1/XRCC3/PDS5B/CDC16/KATNB1/CHMP1B/KIF23/NCAPD2/KIF22/BUB1B/ESPL1/RACGAP1/KIF18B/NUSAP1/CDC20/TTK/KIF2C/TUBG2/PRC1/NDC80/KIF14/CDCA8/KIF4A/CENPF/PSRC1/NUF2/SPAG5/PTTG1/BUB1/NEK2/DLGAP5/CENPE/UBE2C/PLK1/CCNB1
GO:0072073	kidney epithelium development	1,98E-04	IRX1/PTPRO/GATA3/EPHA7/BDNF/EFNB2/GREB1L/FOXC2/SMAD1/NOTCH1/LAMA5/EPHA4/IRX3/PKD1/KANK2/BCL2/FGF2/PKD2/LIF/FOXC1/GDNF/SMAD3/ILK/MYO1E/LAMB2/LGR4/ARG2/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SLIT2/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:0031960	response to corticosteroid	2,32E-03	AREG/BGLAP/GJB2/ADCYAP1/PPARGC1B/IGFBP2/SERPINF1/NEFL/ABCA3/CCN2/PAPPA/NOTCH1/STC1/BCL2L11/BCL2/ERRF1/ATP2B1/CDKN1A/ZFP36L1/CAD/PCK2/GOT1/SPARC/ALAD/SRC/FBXO32/FOSB/KLF9/CLDN1/SLIT2/CPN1/S100B/ALPL/MAOB/BCHE
GO:1902850	microtubule cytoskeleton organization involved in mitosis	5,61E-04	MISP/CEP126/PKD1/HSPA1B/GNAI1/HSPA1A/ARHGEF2/CHMP1B/KIF23/PLK2/ESPL1/PTPA/SUN2/RACGAP1/TPX2/NUSAP1/STMN1/KIF2A/CDC20/TTK/TUBG2/PRC1/NDC80/KIF4A/BIRC5/PSRC1/NUF2/NEK2/DLGAP5/CENPA/CENPE/AURKA/PLK1/CCNB1
GO:0071901	negative regulation of protein serine/threonine kinase activity	8,59E-04	SORL1/RGS4/RGS2/LYN/GADD45A/RB1/SPRED3/SH2B3/CDKN1A/LRP5/DUSP3/DUSP4/CHORDC1/ABL1/IPO5/SPRED1/CDKN1B/KAT2B/CAV1/HEXIM1/DUSP14/FBXO7/PRKCD/RGS3/DUSP10/HSPB1/CDKN2C/DUSP16/PLK1/SLC8A1/HMGCR/IL1B/APOE/PTPN22
GO:0050773	regulation of dendrite development	1,88E-03	DCC/HECW2/RELN/MARK1/EPHA4/FBXW8/PPP1R9A/KIF1A/EZH2/EEF2K/PDLIM5/ANKRD27/SS18L1/CUL7/LRP8/VAMP7/PLK2/ADAM10/DBN1/ILK/OBSL1/CDC20/COBL/ID1/PREX1/LZTS3/ZMYND8/TANC2/NFATC4/MEF2C/PTN/LRRK2/APOE/BCL11A
GO:1902107	positive regulation of leukocyte differentiation	2,67E-03	GATA3/INPP5D/PPARGC1B/GAS6/ZBTB46/TESC/IL12A/LEF1/CSF1/GNAS/RUNX3/SLC9B2/GLI2/KLF10/RB1/ZBTB7B/TNFSF9/IL4R/ZFP36L1/LIF/TMEM64/RUNX1/NFKBIZ/TGFB2/DUSP10/EGR3/BCL6/JUN/BTN2A2/SOX13/IL1B/IL1A/CD74/HLA-DRB1
GO:0007088	regulation of mitotic nuclear division	3,71E-03	HECW2/RB1/HSPA1B/PDXP/XRCC3/HSPA1A/CDC16/LRP5/TGFA/CUL7/CHMP1B/CDKN1B/BUB1B/ESPL1/NUSAP1/OBSL1/CDC20/TTK/ANLN/NDC80/CENPF/PTTG1/BUB1/NEK2/DLGAP5/PDGFRB/CENPE/UBE2C/AURKA/PLK1/CCNB1/CDC25C/IL1B/IL1A
GO:0022612	gland morphogenesis	7,33E-05	IGFBP5/AREG/CEACAM1/TGFB2/PROX1/SULF2/ARNTN4/PLXND1/SEMA3C/CSF1/HOXD13/NOTCH1/GLI2/LAMA5/BCL2/EPHA2/LRP5/PLXNA1/DDR1/KDM5B/CAV1/SRC/NFIB/STAT6/RPS6KA1/TGFB2/RARG/NTN1/LAMA1/TGM2/PTN/SULF1
GO:0061041	regulation of wound healing	2,32E-03	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1/F2R/SYTL4/FOXC2/LYN/PROS1/SH2B3/UBASH3B/FGF2/CAV1/SLC12A2/SMAD3/PLAUR/ANXA2/VKORC1/EPHB2/PRKCD/PLAT/KANK1/DUSP10/CD9/PLA2G4A/THBS1/PRKG1/CLDN1/HMGCR/APOE/ABAT/DUOX2
GO:0002504	antigen processing and presentation of peptide or polysaccharide antigen via MHC class II	7,08E-06	SPTBN2/DYNC1L1/SEC13/KIF23/ACTR10/KIF22/AP1M1/RACGAP1/KIF2A/KIF2C/CTS1/KIF4A/SEC24D/IFI30/CTSS/CENPE/THBS1/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0048640	negative regulation of developmental growth	3,90E-05	DCC/OSTN/GDF15/EPHA7/RGS4/SPP1/STC2/RGS2/SEMA3C/MAPK11/FGFR3/WWC1/WWC2/SPART/TP73/CDKN1A/RNF6/CDKN1B/SEMA7A/BBS2/JARID2/SEMA4C/SEMA4G/TGFB2/MEIS1/SEMA3E/DUSP10/NTN1/SOCS2/CXADR/SEMA3G/BCL11A
GO:0072006	nephron development	2,03E-03	IRX1/PDGFD/PTPRO/GATA3/SULF2/GREB1L/FOXC2/PLCE1/NOTCH1/LAMA5/IRX3/PKD1/BCL2/FGF2/PKD2/ITGA3/LIF/FOXC1/GDNF/ILK/MYO1E/LAMB2/LGR4/PDGFRB/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/SULF1/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:0042542	response to hydrogen peroxide	2,66E-03	AREG/PDGFD/TXNIP/SIGMAR1/KLF4/BCL2/EZH2/PAWR/ETS1/KDM6B/MDM2/GLRX2/PYCR1/ABL1/NQO1/FYN/SOD1/SRC/STAT6/RHOB/PRKCD/PINK1/LDHA/PLEKHA1/PDGFRB/JUN/BNIP3/SLC8A1/KLF2/LRRK2/GPR37/LCN2
GO:0048813	dendrite morphogenesis	2,66E-03	DCLK1/HECW2/RELN/EPHA4/TRAK1/FBXW8/PPP1R9A/KIF1A/EEF2K/PDLIM5/RBFOX2/ANKRD27/SS18L1/CUL7/LRP8/FYN/BTBD3/VAMP7/ADAM10/DBN1/ILK/OBSL1/ID1/EPHB2/EPHB3/LZTS3/TANC2/DLG4/NFATC4/EPHB1/PTN/LRRK2
GO:0051384	response to glucocorticoid	2,92E-03	AREG/BGLAP/GJB2/ADCYAP1/PPARGC1B/IGFBP2/SERPINF1/NEFL/ABCA3/PAPPA/STC1/BCL2L11/BCL2/ERRF1/ATP2B1/CDKN1A/ZFP36L1/CAD/PCK2/GOT1/SPARC/ALAD/FBXO32/FOSB/KLF9/CLDN1/SLIT2/CPN1/S100B/ALPL/MAOB/BCHE
GO:0014074	response to purine-containing compound	3,47E-03	THBD/IGFBP5/HCN1/AREG/TRPC3/HCN2/PPARGC1B/VGF/P2RX5/STC1/AHR/PER1/PDXP/PPARG/EEF2K/ZFP36L1/PKD2/CAD/SPARC/APP/SOD1/SLC26A6/LDHA/ITPR2/FOSB/PDE3A/TRPV1/SLC8A1/IL1B/CITED1/P2RX7/DUOX2
GO:0019886	antigen processing and presentation of exogenous	7,08E-06	SPTBN2/DYNC1L1/SEC13/KIF23/ACTR10/KIF22/AP1M1/RACGAP1/KIF2A/KIF2C/CTS1/KIF4A/SEC24D/IFI30/CTSS/CENPE/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2

	peptide antigen via MHC class II		
GO:0002495	antigen processing and presentation of peptide antigen via MHC class II	1,43E-05	SPTBN2/DYNC1L2/SEC13/KIF23/ACTR10/KIF22/AP1M1/RACGAP1/KIF2A/KIF2C/CTSF/KIF4A/SEC24D/IFI30/CTSS/CENPE/SEC23A/HLA-DPA1/HLA-DMA/HLA-DPB1/LAG3/CD74/HLA-DMB/HLA-DRA/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DOA/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0046683	response to organophosphorus	1,50E-03	THBD/IGFBP5/HCN1/AREG/TRPC3/HCN2/PPARGC1B/VGF/P2RX5/STC1/AHR/PER1/PDXP/EEF2K/ZFP36L1/PKD2/RFC3/SPARC/APP/SOD1/SLC26A6/LDHA/ITPR2/FOSB/PDE3A/TRPV1/SLC8A1/IL1B/CITED1/P2RX7/DUOX2
GO:0007266	Rho protein signal transduction	2,73E-03	C15orf62/F2RL1/F2R/F2RL2/RIPOR2/CDC42EP1/ROCK2/KANK2/TAX1BP3/PLEKHG5/ADGRG1/ITGA3/A RHGEF2/ABL1/HACD3/ARHGAP5/STMN1/RTKN/FLOT1/RHOB/KANK1/BCL6/PDGFRB/ROBO1/NTN1/SHTN1/NGFR/APOE/CDC42EP5/ROPN1B/LPAR4
GO:0007052	mitotic spindle organization	4,29E-04	MISP/CEP126/PKD1/HSPA1B/GNAI1/HSPA1A/CHMP1B/KIF23/PLK2/PTPA/SUN2/RACGAP1/TPX2/STMN1/KIF2A/CDC20/TTK/TUBG2/PRC1/NDC80/KIF4A/BIRC5/PSRC1/NUF2/NEK2/DLGAP5/CENPE/AURKA/PLK1/CCNB1
GO:0060333	interferon-gamma-mediated signaling pathway	1,05E-05	TRIM25/PPARG/CAMK2D/PARP14/B2M/SOCS3/PRKCD/HLA-A/IFNGR2/IFI30/HLA-C/TRIM62/GBP2/HLA-E/HLA-B/IRF5/MT2A/TRIM22/CIITA/HLA-DPA1/HLA-DPB1/HLA-DRA/NCAM1/HLA-DRB5/HLA-DRB1/HLA-DQB1/HLA-DQB2/HLA-DQA1/HLA-DQA2
GO:0048709	oligodendrocyte differentiation	9,74E-05	NTRK2/DLX2/TNFRSF21/NOTCH1/LYN/WASF3/TP73/PPARG/DLX1/B4GALT5/SOX10/GSN/B4GALT6/CNP/CNTNAP1/DUSP10/CD9/MYRF/CDKN2C/BNIP3/SOX6/SOX13/PTN/TMEM98/PTPRZ1/PLP1/TPPP/KCNI10/TENM4
GO:2000134	negative regulation of G1/S transition of mitotic cell cycle	4,48E-03	BTG2/PLAGL1/E2F7/CTDSPL/GADD45A/PLK3/KLF4/SLFN11/RB1/KANK2/BCL2/EZH2/E2F1/CDKN1A/MDM2/PKD2/CDKN1B/CNOT7/PLK2/FBXO7/GTSE1/DACT1/CCL2/CDKN2C/AURKA/CCNB1/BTN2A2/CD25C
GO:0001704	formation of primary germ layer	4,94E-03	ITGA8/LEF1/FOXC2/SMAD1/COL6A1/FN1/COL5A1/KLF4/COL4A2/HMGA2/EPHA2/KDM6B/ITGA3/DUSP4/FOXC1/ITGB4/HSBP1/ACVR1/SMAD3/LAMB3/MMP15/FZD7/COL7A1/MMP2/INHBA/COL5A2/ITGA7/COL11A1
GO:0002062	chondrocyte differentiation	1,22E-03	TGFBI/SULF2/PTHLH/CCN2/RUNX3/FGFR3/CCN3/GLI2/CHST11/HMGA2/ANXA6/IFT80/RUNX1/NFIB/SMAD3/COL27A1/TGFB2/RARG/LOXL2/SOX6/MEF2C/WNT2B/SULF1/COL11A1/NPPC/ACAN/MAF
GO:0006664	glycolipid metabolic process	3,08E-03	B3GALT1/ST8SIA4/B4GALNT1/B3GNT5/CLN6/PGAP4/PIGW/FUCA1/ST3GAL4/B4GALT5/PIGM/DPM2/E SYT2/CTSA/B4GALT6/ST3GAL5/PRKCD/GLA/GBGT1/ITGB8/UGT8/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/LARGE1
GO:0072009	nephron epithelium development	3,08E-03	IRX1/PTPRO/GATA3/GREB1L/FOXC2/NOTCH1/LAMA5/IRX3/PKD1/BCL2/FGF2/PKD2/LIF/FOXC1/GDNF/ILK/MYO1E/LAMB2/LGR4/WNK4/MAGED1/MEF2C/WNT2B/CITED1/TFAP2B/CALB1
GO:1903509	liposaccharide metabolic process	3,47E-03	B3GALT1/ST8SIA4/B4GALNT1/B3GNT5/CLN6/PGAP4/PIGW/FUCA1/ST3GAL4/B4GALT5/PIGM/DPM2/E SYT2/CTSA/B4GALT6/ST3GAL5/PRKCD/GLA/GBGT1/ITGB8/UGT8/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/LARGE1
GO:0032963	collagen metabolic process	4,26E-03	MMP1/F2R/CCN2/LARP6/COL5A1/TNXB/PPARG/ERRFI1/GOT1/P3H1/ID1/MRC2/MMP17/VIM/RCN3/P3H2/MMP15/CTSS/PDGFRB/MMP2/CIITA/COL15A1/COL19A1/MMP25/P2RX7/NPPC
GO:0003279	cardiac septum development	4,78E-03	TGFB2/GATA3/PROX1/FGFRL1/PLXND1/SEMA3C/ZFPM2/NOTCH1/ANK2/CHD7/MDM2/ACVR1/SUFU/EGLN1/CRELD1/TGFB2/STRA6/CITED2/FZD1/ADAMTS6/ROBO1/DNAH11/SLIT2/HEY2/DHRS3/GJA5
GO:0050818	regulation of coagulation	8,15E-04	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1/F2R/LYN/PROS1/SH2B3/UBASH3B/CAV1/PLAUR/ANXA2/VKORC1/EPHB2/PROCR/PRKCD/PLAT/CD9/PLA2G4A/THBS1/PRKG1/APOE/ABAT
GO:0007044	cell-substrate junction assembly	3,53E-03	EPHA3/APOD/TNS1/FN1/ROCK2/BCL2/MACF1/DUSP3/AJUBA/VCL/ITGB4/ABL1/PIP5K1A/MAP4K4/SRC/SMAD3/BCAS3/CORO1C/LAMB3/THBS1/SORBS1/COL16A1/KDR/GPM6B
GO:0150115	cell-substrate junction organization	4,98E-03	EPHA3/APOD/TNS1/FN1/ROCK2/BCL2/MACF1/DUSP3/AJUBA/VCL/ITGB4/ABL1/PIP5K1A/MAP4K4/SRC/SMAD3/BCAS3/CORO1C/LAMB3/THBS1/SORBS1/COL16A1/KDR/GPM6B
GO:0030193	regulation of blood coagulation	7,67E-04	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1/F2R/LYN/PROS1/SH2B3/UBASH3B/CAV1/PLAUR/ANXA2/VKORC1/EPHB2/PRKCD/PLAT/CD9/PLA2G4A/THBS1/PRKG1/APOE/ABAT
GO:1900046	regulation of hemostasis	8,95E-04	CD36/THBD/SERPINE1/CEACAM1/F2RL1/F2R/LYN/PROS1/SH2B3/UBASH3B/CAV1/PLAUR/ANXA2/VKORC1/EPHB2/PRKCD/PLAT/CD9/PLA2G4A/THBS1/PRKG1/APOE/ABAT
GO:0007422	peripheral nervous system development	8,24E-04	SERPINI1/NTRK2/BDNF/RUNX3/DICER1/SKI/SOX10/SOD1/GDNF/RUNX1/ERBB3/ILK/LAMB2/GSTM3/CNTNAP1/EGR3/SLC5A3/UGT8/NDRG1/CLDN1/NFASC/LAMA2
GO:0014031	mesenchymal cell development	2,44E-03	EDNRA/SEMA3C/FOXC2/NOTCH1/FN1/KBTBD8/LAMA5/BCL2/FOXC1/NOLC1/ANXA6/SOX10/GDNF/SEMA7A/ACVR1/SEMA4C/SEMA4G/CORO1C/SEMA3E/ZEB2/HEY2/SEMA3G
GO:0009791	post-embryonic development	3,08E-03	GATA3/FZD5/SEMA3C/GNAS/TIPARP/DHCR7/KLF4/BCL2L11/CHST11/BCL2/PLAGL2/ABL1/ERCC1/KDM5B/NR4A2/MYO1E/ETNK2/PLEKHA1/FBN1/SOX6/MYO7A/NPPC
GO:0034109	homotypic cell-cell adhesion	3,08E-03	MEGF10/CEACAM1/GNAS/LYN/FN1/MYL9/SH2B3/UBASH3B/VCL/TYRO3/PLAUR/CD99/ILK/DSP/PRKCD/HSPB1/CD9/JUP/PRKG1/CXADR/ABAT/ANK3
GO:0021954	central nervous system neuron development	3,84E-03	DCC/DCLK1/NTRK2/BTG2/TSKU/MYCBP2/GLI2/FBXO45/EPHA4/B4GALT5/NFIB/B4GALT6/NR4A2/EPHB2/EPHB3/ROBO1/ZEB2/EPHB1/NANOS1/SLIT2/LHX8

GO:0002088	lens development in camera-type eye	4,48E-03	GATA3/PROX1/NHS/SPRED3/PDS5B/FGF2/EPHA2/SKI/SPRED1/CDKN1B/KDM5B/SMAD3/VIM/TGFBR2/MEIS1/SIX5/BFSP1/SHROOM2/ZEB2/WNT2B/MAF
GO:0000281	mitotic cytokinesis	2,25E-03	TRIM36/ROCK2/CUL7/CHMP1B/KIF23/ESPL1/RACGAP1/NUSAP1/STMN1/ANLN/RHOC/RTKN/PRC1/SNX33/RHOB/KIF4A/CENPA/PLK1/KIF20A/ANK3
GO:0061045	negative regulation of wound healing	4,98E-03	THBD/SERPINE1/CEACAM1/PROS1/SH2B3/UBASH3B/FGF2/SLC12A2/SMAD3/PLAUR/ANXA2/PRKCD/PLAT/DUSP10/CD9/THBS1/PRKG1/HMGCR/APOE/ABAT
GO:0009247	glycolipid biosynthetic process	2,10E-03	B3GALT1/ST8SIA4/B4GALNT1/B3GNT5/PGAP4/PIGW/ST3GAL4/B4GALT5/PIGM/DPM2/B4GALT6/ST3GAL5/GBGT1/UGT8/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/LARGE1
GO:0006687	glycosphingolipid metabolic process	3,96E-03	B3GALT1/ST8SIA4/B4GALNT1/CLN6/B4GALT5/ESYT2/CTSA/B4GALT6/ST3GAL5/PRKCD/GLA/ITGB8/UGT8/ST6GALNAC3/ST6GALNAC5/ST8SIA5/ST8SIA1/LARGE1
GO:0021955	central nervous system neuron axonogenesis	3,87E-05	DCC/DCLK1/TSKU/MYCBP2/GLI2/FBXO45/EPHA4/B4GALT5/NFIB/B4GALT6/NR4A2/EPHB2/EPHB3/ZEB2/EPHB1/SLIT2
GO:0030199	collagen fibril organization	4,77E-03	TGFB2/FOXC2/DDR2/COL5A1/RB1/TNXB/FOXC1/P4HA1/CRTAP/ANXA2/AEBP1/LOXL2/LOXL4/COL5A2/COL11A1/ACAN
GO:0050819	negative regulation of coagulation	4,77E-03	THBD/SERPINE1/CEACAM1/PROS1/SH2B3/UBASH3B/PLAUR/ANXA2/PROCR/PRKCD/PLAT/CD9/THBS1/PRKG1/APOE/ABAT
GO:0046677	response to antibiotic	3,02E-03	GJB2/CYP1A1/EZH2/KDM6B/MDM2/CDKN1B/KDM5B/SOD1/VKORC1/ID1/PLA2G4A/MEF2C/CIITA/AOC3/ALPL
GO:0030195	negative regulation of blood coagulation	5,01E-03	THBD/SERPINE1/CEACAM1/PROS1/SH2B3/UBASH3B/PLAUR/ANXA2/PRKCD/PLAT/CD9/THBS1/PRKG1/APOE/ABAT