

Plan Overview

A Data Management Plan created using DMPTool

Title: Desvendando os mecanismos oncogênicos do lncRNA RMEL3 e seu potencial como alvo terapêutico

Creator: Enilza Espreafico - **ORCID:** [0000-0002-7552-4234](https://orcid.org/0000-0002-7552-4234)

Affiliation: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - FMRP

Contributor: Barbara Yasmin Garcia Andrade, Ricardo Rosa, Benedita Oliveira Souza , Vitor Merino Loes

Funder: São Paulo Research Foundation (fapesp.br)

Grant: 2021/10032-3

Template: Digital Curation Centre (português)

Project abstract:

O melanoma é um câncer de pele altamente agressivo e resistente a terapias. O presente projeto tem como objetivo caracterizar os mecanismos funcionais do RNA longo não-codificante (lncRNA) RMEL3, o qual foi descrito pelo nosso grupo como um transcrito enriquecido em melanoma, especialmente naqueles com a mutação oncogênica BRAFV600E, que se caracteriza como a mutação condutora de tumorigênese mais frequente neste e em outros tipos de câncer. Em trabalhos anteriores, demonstramos que o silenciamento de RMEL3 tem um forte impacto negativo na sobrevivência, proliferação e migração celular de linhagens de melanoma. Esses efeitos foram associados à inibição das vias de MAPK e PI3K e indução de potentes reguladores negativos do ciclo celular, como as proteínas p21 e p27. Condizente com esses dados, a superexpressão de RMEL3 protege contra a parada da proliferação e morte celular causadas por privação de estímulos mitogênicos extracelulares e aumenta o crescimento tumoral em modelo animal. Para compreensão dos mecanismos de ação desse lncRNA buscamos identificar proteínas associadas a ele, através de ensaios de pulldown de RMEL3 endógeno seguido de espectrometria de massas. O ensaio revelou o enriquecimento da fração de RMEL3 com diferentes proteínas diretamente ligadas à via de MAPK, tais como FAM83D, ARAF and STK3/Mst2, cujo papel no controle da proliferação e morte celular é bem estabelecido. Além dessas, várias outras que atuam na regulação do crescimento, morte celular, metabolismo, pluripotência e resposta ao dano no DNA também foram identificadas. Portanto, o presente projeto tem como objetivo validar as interações do RMEL3 com essas proteínas, através de abordagens de imunoprecipitação das proteínas ligantes e pulldown do RNA RMEL3. Além de validar as interações, realizaremos novos ensaios funcionais para avaliar o impacto de silenciar ou superexpressar o RMEL3 sobre a função das proteínas validadas e suas respectivas vias de sinalização, em células de melanoma. Em paralelo, avaliaremos o efeito de silenciar RMEL3 sobre o crescimento de tumores de melanoma em camundongos xenotransplantados.

Start date: 09-01-2022

End date: 08-31-2024

Last modified: 05-10-2023

Copyright information:

The above plan creator(s) have agreed that others may use as much of the text of this plan as they would like in their own plans, and customize it as necessary. You do not need to credit the creator(s) as the source of the language used, but using any of the plan's text does not imply that the creator(s) endorse, or have any relationship to, your project or proposal

Desvendando os mecanismos oncogênicos do lncRNA RMEL3 e seu potencial como alvo terapêutico

- 1) Imagens digitais de células obtidas por microscopia de luz ou eletrônica
- 2) Gráficos e tabelas de dados quantitativos de ensaios de proliferação e morte celular
- 3) Fotografias digitais para documentar a formação de colônias em ensaios clonogênicos de células tumorais
- 4) Fotografias digitais para documentar a formação de colônias em ensaios de crescimento independente de ancoragem de células transformadas
- 5) Gráficos e tabelas de dados de ensaios de migração e invasão celular
- 6) Vídeos digitais obtidos por microscopia de time-lapse de células vivas em cultura, para avaliar fenótipos morfológicos, dinâmica de moléculas intracelulares, migração celular, apoptose e divisão celular
- 7) Fotografias digitais para documentação da separação de proteínas por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)
- 8) Fotografias digitais para documentação da imunodeteção específica de proteínas em membranas de nitrocelulose (western blots)
- 9) Fotografias digitais para documentação de fragmentos de DNA em gel de agarose
- 10) Dados quantitativos de RT-PCR-tempo real para quantificação de RNAs em amostras de RNA total ou em amostras de imunoprecipitados de proteínas específicas.
- 11) Dados de imagem luminescente digitais para acompanhar o crescimento de tumores xenotransplantados em camundongos vivos
- 12) Dados quantitativos do volume tumoral em modelo de xenotransplante subcutâneo em camundongos, para acompanhamento do crescimento tumoral ao longo do tempo
- 13) Listas de genes diferencialmente expressos em células geneticamente manipuladas por métodos de CRISPR ou RNAi.
- 14) Dados de sequenciamento de DNA.
- 15) Dados de proteômica: listas de proteínas e peptídeos identificadas em ensaios de proteômica.
- 16) Mapas de construções de DNA recombinantes em vetores plasmidiais ou virais que serão criados para o estudo.
- 17) Mapas de alterações genômicas criadas com o uso de CRISPR/Cas9, no locus RMEL3, para estudos funcionais e regulatórios.
- 18) Ensaios quantitativos (planilhas/tabelas e gráficos) da progressão no ciclo de crescimento e divisão celular e morte celular realizados por citometria de fluxo.

Todos os dados coletados irão gerar um arquivo digital, sejam eles, imagens de células ao microscópio, fotografias de géis, tabelas de dados numéricos quantitativos gerados por contagem de células, espectrofotometria, citometria, eletroferograma de sequenciamento de DNA ou arquivos texto. Todas as imagens (fotografias) serão armazenadas

em tiff.

O laboratório implementará o uso do software REDCap em substituição aos cadernos e formulários de anotações manuscritas usados para anotações durante os experimentos e coletas de dados em geral e para organização dos reagentes, células e materiais estocados no laboratório. O REDCap (Research Electronic Data Capture) um software livre, tanto para obtenção como para atualizações. Funciona como uma plataforma digital com uso amigável, a partir de um computador, de um tablet ou de um smartphone. Funciona em modos online e offline. Possui ferramentas para gerenciamento dinâmico de dados e permite a importação e exportação de dados, facilita a construção de relatórios reprodutíveis e a transferência de dados para os principais softwares de análises estatísticas, garantindo o máximo de precisão, segurança e rapidez na obtenção de informações. Facilitará a preparação dos metadados e organização dos dados a serem armazenados ou liberados publicamente.

Os dados serão organizados em pastas e subpastas, identificadas, datadas e associadas aos metadados, em computadores de trabalho no laboratório e em seguida serão criados backups em espaço do repositório científico da USP e em nuvens GoogleDrive e Dropbox.

Cada conjunto de dados será coletado conforme normas técnicas e protocolos pré-estabelecidos e explicitados, garantindo a reprodutibilidade dos dados. Os metadados associados a cada experimento serão usados para criar os metadados relativos a cada conjunto de dados de uma maneira lógica. Serão fornecidas informações a respeito das condições gerais, qualidade técnica, e intercorrências durante os experimentos. Os dados serão organizados em pastas e subpastas identificadas e seguindo uma lógica pré-definida. As pastas serão separadas por experimentador (estudante, pós-doutorando, pesquisador responsável). As subpastas serão organizadas conforme os objetivos específicos e abordagem experimental. Os arquivos serão nomeados conforme o experimento e data.

Os dados serão enviado em arquivos. Cada dados será acompanhado de uma descrição que corresponde ao metadado, no padrão Dublin Core. Serão incluídos, o título do projeto, o título do arquivo, nome e ORCID do pesquisador responsável e de pesquisadores e estudantes envolvidos na coleta, resumo do conteúdo do arquivo, data de coleta dos dados, métodos usados para coleta, palavras chave, agências financiadoras e números dos processos.

Há questões éticas relacionadas ao uso de animais experimentais. O protocolo de experimentação com animais experimentais foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal da FMRP-USP.

Os dados produzidos serão de posse e direito do pesquisador responsável pelo projeto. Todos os estudantes e colaboradores envolvidos diretamente na pesquisa serão citados nos metadados e serão autores e co-autores de artigos produzidos.

O compartilhamento dos dados será feito de forma livre para qualquer pesquisador interessado, cuja restrição será a aceitação de um termo de consentimento e responsabilidade para uso dos dados, que será elaborado em parceria com a Universidade de São Paulo.

Durante a pesquisa os dados serão armazenados em computador local do laboratório e ao menos duas cópias backup serão armazenadas no repositório de dados científicos da USP (<https://uspdigital.usp.br/repositorio>) e em espaço de nuvens, tais como, GoogleDrive e Dropbox sob responsabilidade do pesquisador responsável. O GoogleDrive e Dropbox já funcionam como recursos para armazenamento de dados no laboratório do pesquisador

responsável, sob deste. O limite do repositório da USP é de 2Gb, portanto, se houver necessidade devemos obter recursos para contratar espaço adicional no repositório de dados de pesquisa da USP ou no Dropbox.

Todas as imagens (fotografias) serão armazenadas em arquivos tiff. Vídeos em arquivos mov; vídeos com audio poderá ser arquivado em mp4 ou outro compatível que se fizer necessário. Planilhas de dados numéricos e listas de dados serão salvos em xls, xlsx e/ou xlsxm.

A responsabilidade de manutenção, backups e recuperação dos dados será do coordenador do projeto (pesquisador responsável).

O repositório de dados científicos da USP, em parceria com a STI da USP, garantirá a tecnologia de segurança para armazenamento e acesso aos dados. Os backups em nuvens GoogleDrive ou Dropbox ficarão sob responsabilidade do Pesquisador responsável pelo projeto.

Todos os dados obtidos são em tese de valor a longo prazo, pois fornecem informações sobre os experimentos realizados e contribuem para se julgar a confiabilidade dos resultados. O trabalho normalmente gera um número redundante e muito maior de imagens de microscopia e de géis (proteína e DNA) do que aquele passível de publicação. São publicadas as imagens representativas e de melhor qualidade dentre as obtidas. No entanto, todas as imagens e resultados analisados, que passarem pelo crivo como corretos do ponto de vista metodológico, devem ser armazenados e serão liberados em plataforma pública após publicação do artigo, pois podem fornecer informações extras não explicitadas no artigo publicado.

Dados de genômica e proteômica são de valor a longo prazo e serão depositados em Bancos de dados públicos específicos, GenBank e PRIDE, respectivamente, antes da submissão do artigo para publicação.

Os dados serão depositados nos repositórios apropriados conforme especificado nos tópicos anteriores e no repositório de dados científicos da USP (<https://uspdigital.usp.br/repositorio>). Poderemos também usar repositórios reconhecidos como o ZENODO. Os dados depositados em repositórios deverão ser registrados no <https://www.re3data.org/search?query=>, como fechados ou abertos. Isso permite divulgar ampliar os domínios de divulgação dos dados.

Todos os repositórios escolhidos disponibilização pública dos dados serão aqueles que atribuam, ao conjunto de dados, um DOI ou um código, que possa ser citado em referências bibliográficas de artigos que vierem a utilizar aqueles dados. Desse modo as citações serão computadas por instituições como WEB of Science e ORCID do pesquisador, permitindo que este obtenha o devido reconhecimento pela contribuição.

Os dados a serem preservados e disponibilizados ao público serão aqueles selecionados como valiosos e informativos. O dado cru (conforme foi gerado pelo equipamento) será preservado para se evitar a perda ou deturpação de informações, conforme recomendações no <https://old.dataone.org/best-practices/identify-data-long-term-value>. No entanto, tais dados também serão convertidos para formatos tiff, mp4, por exemplo, que são compatíveis com softwares comuns, amplamente usados. Concluindo, nossa política será depositar os dados em repositórios públicos tais como os mencionados. A preservação à longo prazo ficará garantida conforme a política de preservação de dados de pesquisa da instituição ou de acordo com as normas do repositório.

Os metadados serão disponibilizados na plataforma pública durante o desenvolvimento do projeto e os dados serão liberados após a publicação do artigo, sob licença CC-BY. Para acelerar a liberação dos dados, adotaremos o sistema de depósito do preprint do artigo no BioRxiv <https://www.biorxiv.org/>.

Dados genômicos serão submetidos ao GenBank, conforme instruções no site: <https://submit.ncbi.nlm.nih.gov/>

Dados proteômicos serão submetidos ao PRIDE: <https://www.ebi.ac.uk/pride/markdownpage/submitdatapage>

Todos os dados serão mantidos em um repositório seguro e em pelo menos duas cópias de backup, como explicitado no tópico armazenamento e backup. A responsabilidade de manutenção, backups e recuperação dos dados será do coordenador do projeto (pesquisador responsável).

Não. O compartilhamento deverá seguir as normas estabelecidas do repositório de dados a ser usado. Sou favorável ao compartilhamento de acordo com as licenças Creative Commons CC-BY ou CC-BY-SA.

Nas atribuições CC-BY e CC-BY-SA, os licenciados têm o direito de copiar, distribuir, exibir e executar a obra, fazer trabalhos derivados dela e inclusive obter lucros com o uso dos dados, conquanto que deem créditos devidos ao autor ou licenciador, na maneira especificada por estes. A diferença entre CC-BY e CC-BY-SA é que esta exige que o licenciado também libere seus dados sob a mesma forma de licença.

A responsabilidade pelos dados e pelo gerenciamento dos dados será do pesquisador responsável pelo projeto.

O repositório de dados científicos da USP, em parceria com a STI da USP, garantirá a tecnologia de segurança para armazenamento e acesso aos dados.

A execução do plano necessitará de recursos para armazenamento e preparação dos dados para depósito (hardwares) e auxílio financeiro na forma de Bolsa para técnicos, com a finalidade de colaborar na organização e preparação de dados para depósito. Será necessário, também, o treinamento do pesquisador responsável e de todo o grupo envolvido na pesquisa, para uso do repositório de dados científicos da USP, bem como para o uso do software REDCap (software livre).

Custos adicionais poderão ser necessários para aumentar a capacidade armazenamento dos dados, caso a quantidade de dados ultrapasse o limite inicialmente fornecido pelo repositório (2GB).

Planned Research Outputs

Image - "RNA in situ hybridization to map the subcellular localization of RMEL3 lncRNA in the A375 human melanoma cells"

A375 melanoma cells were fixed and incubated with biotinylated LNA probes (single strand DNA LNA oligonucleotides): anti-sense (A) to hybridize with endogenous RMEL3 lncRNA and sense (non-hybridizing probe) used as a control (B). The detection was done by incubation with streptavidin–Alexa Fluor[®] 488 conjugate. The assay was performed according to the protocol described in Raj A, van den Bogaard P, Rifkin SA, van Oudenaarden A, Tyagi S. Imaging individual mRNA molecules using multiple singly labeled probes. Nat Methods. 2008 Oct;5(10):877-9. doi: 10.1038/nmeth.1253.

Planned research output details

Title	Type	Anticipated release date	Initial access level	Intended repository(ies)	Anticipated file size	License	Metadata standard(s)	May contain sensitive data?	May contain PII?
RNA in situ hybridization to map the subcellular l ...	Image	2022-12-31	Open	None specified	2 MB	Creative Commons Attribution 4.0 International	None specified	No	No