

**MASARYKOVA UNIVERZITA**

**Přírodovědecká fakulta**

**BAKALÁŘSKÁ PRÁCE**

**Brno 2014**

**Veronika Krmeská**



**MASARYKOVA UNIVERZITA**  
**Přírodovědecká fakulta**  
**Ústav experimentální biologie**  
**Oddělení genetiky a molekulární**  
**biologie**

---



# **Úloha dlouhých nekódujících RNA v živočišných buňkách a kancerogenezi**

**Bakalářská práce**

**Veronika Krmeská**

## Bibliografický záznam

**Autor:** Veronika Krmeská  
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita  
Ústav experimentální biologie

**Název práce:** Úloha dlouhých nekódujících RNA v živočišných buňkách a kancerogenezi

**Studijní program:** Experimentální biologie

**Studijní obor:** Molekulární biologie a genetika

**Vedoucí práce:** MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.

**Akademický rok:** 2013/2014

**Počet stran:** 46

**Klíčová slova:** lncRNA; ANRIL, MEG3; XIST, MALAT-1; H19

## Bibliographic Entry

**Author:** Veronika Krmeská  
Faculty of Science, Masaryk University  
Department of Experimental Biology

**Title of Thesis:** The role of long-non-coding RNAs in animal cells and cancerogenesis

**Degree Programme:** Experimental biology

**Field of Study:** Molecular Biology and Genetics

**Supervisor:** MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D

**Academic Year:** 2013/2014

**Number of Pages:** 46

**Keywords:** lncRNA; ANRIL, MEG3; XIST, MALAT-1; H19

## **Abstrakt**

V současnosti se zdá, že množství genů kódujících proteiny tvoří jen cca 1,5% genomu člověka a vyšších živočichů, přičemž až třetina genomu je přepisovaná do RNA. Takovéto proteiny-nekódující RNA mohou mít zásadní funkce v regulaci buněčné fyziologie a jejich aberantní exprese byla popsána u mnoha nádorových i nenádorových chorob. Bakalářská práce se zabývá skupinou dlouhých nekódující RNA (long-non-coding RNA, lncRNA), které jsou obvykle definovány délkou větší než 200 nukleotidů. Popisuje obecné mechanismy jejich působení, příklady jejich významu ve fyziologii živočišných buněk (např. apoptóza, proliferace, diferenciací) a shrnuje jejich význam pro kancerogenezi s důrazem na hematologické malignity, kde již byl jejich význam popsán.

## **Abstract**

Nowadays, it seems that protein coding genes in humans and higher animals are just 1,5% of the genome, but more than one third of all genes is transcribed into RNA. This noncoding genes can have important functions in regulations of cell processes and their aberrant expression was described in many cancer types and other diseases. This bachelor thesis deals with long noncoding RNAs (lncRNA), which are defined as RNAs longer than 200 nucleotids. There are described general mechanisms of how lncRNAs work, examples in animal cell physiology (apoptosis, proliferation, differentiation) and summary of their importance in cancerogenesis with emphasis on hematological malignities.



Masarykova univerzita



Přírodovědecká fakulta

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

Student: **Veronika Krmeská**  
Studijní program: **Experimentální biologie**  
Studijní obor: **Molekulární biologie a genetika**  
Studijní směr: **Molekulární biologie a genetika**

Ředitel Ústavu experimentální biologie PřF MU Vám ve smyslu Studijního a zkušebního řádu MU určuje bakalářskou práci s tématem:

### Úloha dlouhých nekódujících RNA v živočišných buňkách a kancerogenezi

The role of long-non-coding RNAs in animal cells and cancerogenesis

*Oficiální zadání:*

V současnosti se zdá, že množství genů kódujících proteiny tvoří jen cca 1,5% genomu člověka a vyšších živočichů, přičemž až třetina genomu je přepisovaná do RNA. Takovéto proteiny-nekódující RNA mohou mít zásadní funkce v regulaci buněčné fyziologie a jejich aberantní exprese byla popsána u mnoha nádorových i nenádorových chorob. V bakalářské práci se student(ka) bude zabývat skupinou dlouhých nekódujících RNA (long-non-coding RNA, lncRNA), které jsou obvykle definovány délkou větší než 200 nukleotidů. Budou popsány obecné mechanismy jejich působení, příklady jejich významu ve fyziologii živočišných buněk (např. apoptóza, proliferace, diferenciace) a shrnut jejich význam pro kancerogenezi s důrazem na hematologické malignity, kde již byl jejich význam popsán.

*Literatura:*

1. Shi X, Sun M, Liu H, Yao Y, Song Y. Long non-coding RNAs: a new frontier in the study of human diseases. *Cancer Lett.* 2013 Oct 10;339(2):159-66.
2. Wahlestedt C. Targeting long non-coding RNA to therapeutically upregulate gene expression. *Nat Rev Drug Discov.* 2013 Jun;12(6):433-46.
3. Cheetham SW, Gruhl F, Mattick JS, Dinger ME. Long noncoding RNAs and the genetics of cancer. *Br J Cancer.* 2013 Jun 25;108(12):2419-25.
4. Van Roosbroeck K, Pollet J, Calin GA. miRNAs and long noncoding RNAs as biomarkers in human diseases. *Expert Rev Mol Diagn.* 2013 Mar;13(2):183-204. doi: 10.1586/erm.12.134.

*Jazyk závěrečné práce: slovensky*

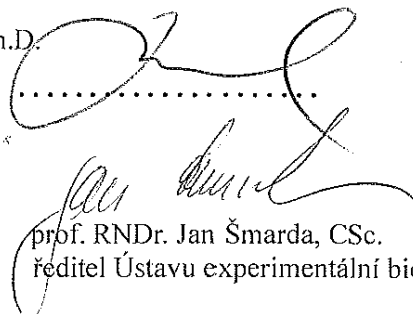
*Vedoucí bakalářské práce: MUDr. Mgr. Marek Mráz, Ph.D.*

*Podpis vedoucího práce:*


*Konzultant:*

*Datum zadání bakalářské práce:*

V Brně dne 13.11.2013

  
prof. RNDr. Jan Šmarda, CSc.  
ředitel Ústavu experimentální biologie

Zadání bakalářské práce převzal dne 13.11.2013

  
Podpis studenta

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Markovi Mrázovi za cenné rady a čas, který mi věnoval při zpracování bakalářské práce.

## Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji bakalářskou práci vypracoval/a samostatně s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

**Brno 9.5.2014**



.....  
**Veronika Krmeská**



# Obsah:

<b>Zoznam skratiek.....</b>	<b>9</b>
<b>1. Úvod.....</b>	<b>11</b>
<b>2. Nekódujúca časť genómu.....</b>	<b>12</b>
2.1. Malá nekódujúca RNA.....	12
2.2. Dlhá nekódujúca RNA.....	13
2.3. Funkcia lncRNA.....	15
<b>3. LncRNA a kancerogénna.....</b>	<b>17</b>
3.1. <i>MEG3</i> .....	18
3.1.1. <i>MEG3</i> izoformy.....	18
3.2.1. Mechanizmus pôsobenia.....	19
3.2.3. <i>MEG3</i> v nádoroch.....	21
3.2. <i>H19</i> .....	22
3.2.1. Lokus.....	22
3.2.2. Mechanizmus pôsobenia.....	24
3.3. <i>XIST</i> .....	27
3.3.1. Lokus.....	27
3.3.2. Mechanizmus pôsobenia.....	28
3.3.3. <i>XIST</i> v nádoroch.....	30
3.4. <i>MALAT-1</i> .....	32
3.4.1. Forma.....	32
3.4.2. Mechanizmus pôsobenia.....	33
3.5. <i>ANRIL</i> .....	36
3.5.1. Lokus.....	36
3.5.2. Mechanizmus pôsobenia.....	37
<b>4. Záver .....</b>	<b>40</b>
<b>Literatúra .....</b>	<b>41</b>

## Zoznam skratiek

ALL – akútna lymfatická leukémia

ANRIL - antisense non-coding RNA in the INK4 locus

ARF – alternative reading frame

AS – alternatívny zostrih

ASO – antisense oligonukleotidy

Bmi1 – podjednotka PRC1

cAMP – cyklický AMP

CBP – CREB binding protein

CBX7 – chromobox 7 (podjednotka PRC1)

CCT4 - chaperonin-containing tailless complex polypeptide, subunit 4

CDK – cyklín-dependentná kináza

CDKN2B-AS1 - CDKN2B antisense RNA 1 (=ANRIL)

CRC – kolorektálny karcinóm

CRE – cAMP response element

CREB – CRE binding protein

CTCF – CCTC-binding factor

CTHRC1 - collagen triple helix repeat containing 1

DMR – differentially methylated regions

Enox - expressed neighbor of Xist (=Jpx)

Ezh2 - Enhancer of zeste 2 (podjednotka PRC2)

HAT – histon acetyltransferáza

HOTS - H19 opposite tumor suppressor

ICR - imprinting control regions

IG-DMR – intergenic differentially methylated regions

IGF2 - insuline-like growth factor 2

lincRNA – long intergenic RNA

lncRNA – dlhá nekódujúca RNA (long noncoding RNA)

LOI – loss of imprinting

MALAT-1 - Metastasis Associated in Lung Adenocarcinoma Transcript 1

mascRNA - MALAT1-Associated Small Cytoplasmic RNA

MDM2 – mouse double minute 2

MEG3 – maternally expressed gene 3

miRNA – mikro RNA

ncRNA – nekódujúca RNA

NEAT2 - Nuclear-Enriched Abundant Transcript 2 (=MALAT-1)

NES – nuclear transport sequence

NSCLC - non-small cell lung cancer

ORF – otvorený čítací rámeč (open reading frame)

p15AS – p15 antisense RNA (=ANRIL)

PCA3 – prostate cancer antigen 3

piRNA – piwi interacting RNA

PRC1 – polycomb repressive complex 1

PRC2 – polycomb repressive complex 2

PROMPTs - promoter upstream transcripts

siRNA – short interfering RNA

snoRNA - small nucleolar RNA

snRNA – small nuclear RNA

Suz12 – podjednotka PRC2

RepA – repeat A (súčasť XIST transkriptu)

Xa – aktívny X chromozóm

Xi – inaktivovaný X chromozóm

XIC – X-inaktivačné centrum

XIST – X inactive specific transcript

# 1. Úvod

Dlhé nekódujúce RNA (lncRNA) sú definované ako RNA o dĺžke nad 200 nukleotidov, ktoré nie sú translatované do proteínov. LncRNA sú zahrnuté v mnohých bunkových procesoch ako je proliferácia, diferenciácia, apoptóza, migrácia a ďalšie. Ich aberantná expresia sa často vyskytuje v nádorových aj nenádorových ochoreniach, preto sa táto oblasť výskumu dá považovať za vysoko zaujímavú.

Na začiatku práce je uvedená charakteristika lncRNA, jej klasifikácia a popis niektorých základných mechanizmov pôsobenia, ktorými dokáže ovplyvňovať expresiu iných génov. V nasledujúcej kapitole je rozobratých päť príkladov lncRNA (*MEG3*, *H19*, *XIST*, *MALAT-1* a *ANRIL*), ktoré sú známe práve pre svoj vplyv na vývoj nádorových ochorení, alebo hematologických malignít. *MEG3* spolupracuje s proteínom p53 a jej expresia je býva redukovaná vo viacerých nádoroch. *H19* vzniká prepisom z onkofetálneho génu a jej množstvo je závislé od hypoxie a p53. *XIST* sa zúčastňuje inaktivácie X chromozómu a patrí medzi jednu z najstarších známych dlhých nekódujúch RNA. *MALAT-1* ovplyvňuje alternatívny zostrih v niektorých typoch buniek. *ANRIL* sa nachádza na lokuse spolu s génmi potrebnými pre progres bunkového cyklu, ktoré zároveň reguluje.

V závere je zhrnuté možné praktické využitie lncRNA v medicíne.

## 2. Nekódujúca časť genómu

Odhadovaný počet génov v ľudskom genóme bol stanovený na približne 20 000, pričom ešte donedávna sa predpokladalo asi trojnásobne vyššie množstvo. Napriek tomu, množstvo DNA, ktoré kóduje proteín sa odhaduje na 1,5%, transkribovaná časť genómu však zaberá až okolo 75%. Túto transkribovanú časť, ktorá následne nepodstupuje transláciu do proteínu tvoria nekódujúce RNA (ncRNA).

Dlhé roky panovalo v biológii presvedčenie, že tieto obrovské množstvá genetických informácií obsiahnutých v intrónoch alebo medzi génmi, nemajú žiadnu funkciu. V posledných rokoch sa však ukazuje, že tento predpoklad bol nepresný.

Na tomto mieste by bolo vhodné spomenúť, že tak ako je známy paradox hodnoty C (množstvo DNA nekoreluje s narastajúcou biologickou komplexitou), existuje aj paradox hodnoty G. Ten vyjadruje neuplatnené očakávanie, že vyššia biologická komplexnosť organizmu bude súvisieť s vyšším počtom génov kódujúcich proteíny. Čiastočne sa dá tento paradox vysvetliť alternatívnym zosteriom, ktorý umožňuje expresiu viacerých proteínov z jednej sekvencie. Taft *et al.* (2007) tvrdia, práve naopak, že to, čo sa zvyšuje spolu s biologickou komplexitou je množstvo DNA, z ktorej nevzniká žiadny proteín. Ich tvrdenie sa zakladá na pozorovaní pomeru nekódujúcej DNA k celkovej veľkosti genómu organizmu (nc/tg), (obr. 1).

Vyvstala otázka, či by mali tieto stovky až tisícky nových identifikovaných lokusov pre ncRNA byť považované za gény a teda pridané k aktuálnemu listu génov, ktoré kódujú proteíny (Ponting *et al.*, 2010).

### 2.1. Malá nekódujúca RNA

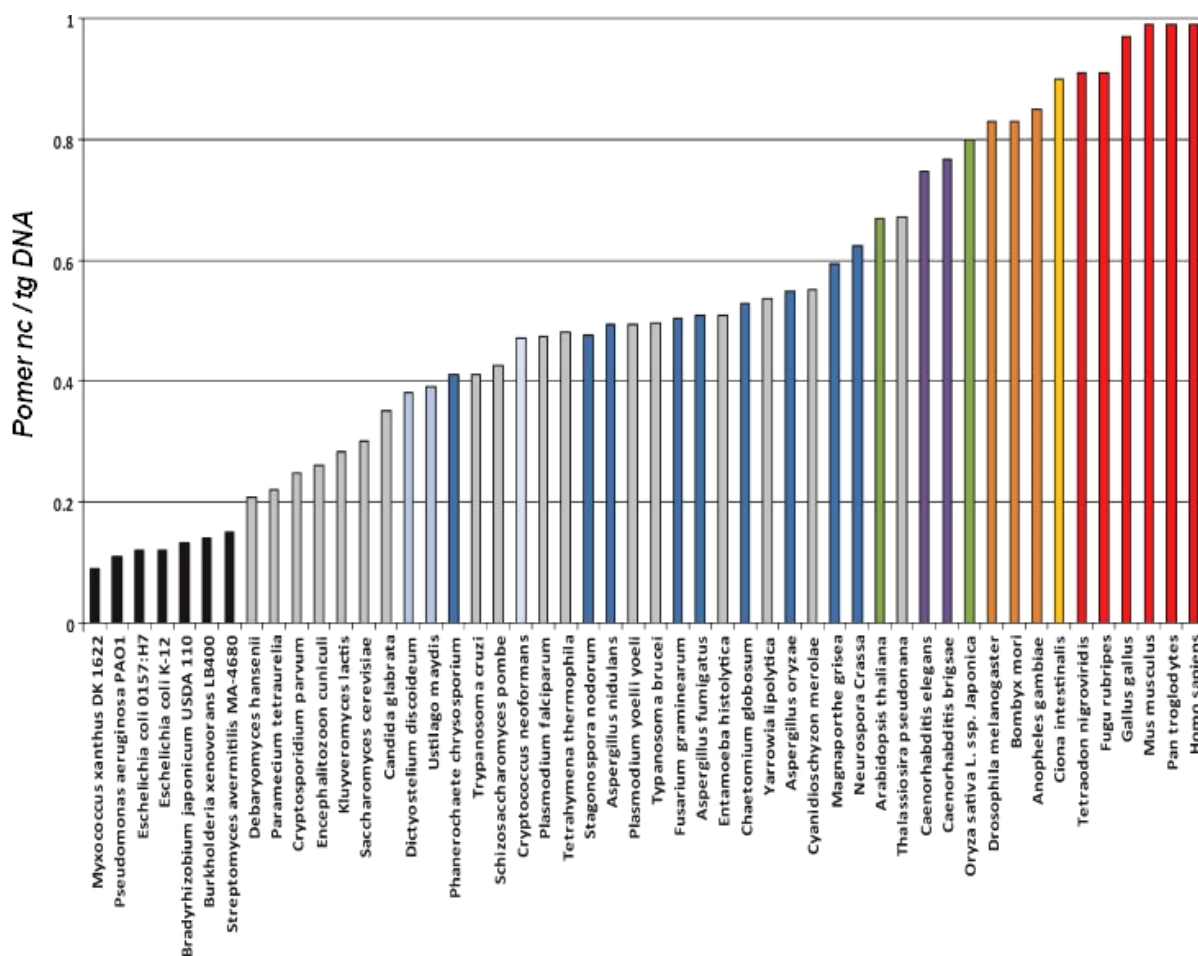
Bolo klasifikovaných niekoľko tried ncRNA. Rôzne druhy ncRNA vykazujú rôzny stupeň konzervácie, a teda rôznu evolučnú rýchlosť.

Medzi najznámejšie ncRNA patrí transferová (tRNA) a ribozomálna (rRNA) RNA, zúčastňujúce sa pri translácii proteínov.

K malým nekódujúcim RNA sa radí miRNA (*microRNA*), siRNA (*short interfering RNA*), piRNA (*piwi interacting*), snRNA (*small nuclear*) a snoRNA (*small nucleolar*).

siRNA a miRNA sú zahrnuté v regulácii expresie a degradácii mRNA. siRNA sú malé duplexy RNA spracované Dicerom a ich cieľová RNA je väčšinou cudzieho pôvodu (vírusy, transpozóny). MikroRNA je pôvodom jednoret'azcová a tvorí vlásenku. piRNA dostali názov

podľa ich interakcie s piwi proteínmi a boli nájdené v zárodočných bunkách cicavcov, rýb a u drozofily. snRNA sa podieľajú na zostrihu mRNA, a snoRNA na modifikácii iných molekúl RNA.



**Obz.1** Rastúce množstvo nekódujúcej časti genómu u organizmov. Čiernou farbou sú znázornené štyri najväčšie prokaryotické genómy a dva najznámejšie bakteriálne druhy. Sivé sú jednobunkové organizmy, svetlomodrou organizmy, ktoré môžu byť jedno alebo viacbunkové (podľa fázy životného cyklu), modrou jednoduché viacbunkové organizmy, rastliny sú zelené, hľistovce fialové, článkonožce oranžové, chordáty žlté a stavovce sú znázornené červenou farbou (Taft *et al.*, 2007; upravené).

Pokiaľ ide o konzerváciu medzi druhmi, miRNA a snoRNA majú vysokú mieru identity medzi človekom a myšou (miRNA 90% a snoRNA 80-90%), zatiaľ čo dlhšie ncRNA sú konzervované slabšie (Pang *et al.*, 2006).

## 2.2. Dlhá nekódujúca RNA

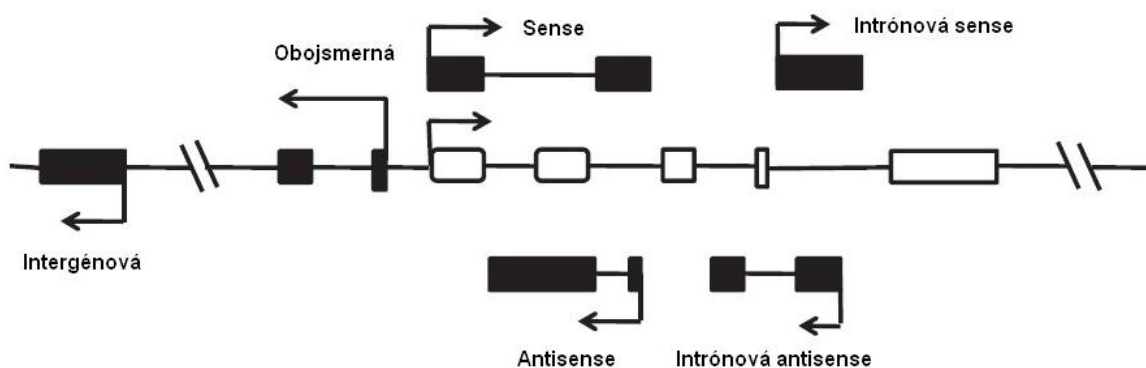
Dlhá nekódujúca RNA (*long noncoding RNA* - skrátene lncRNA) je definovaná ako RNA transkript dlhší ako 200 nt, ktorý sa neprekladá do proteínu. Ich transkripciu vykonáva RNA

polymeráza II, často sú polyadenylované a špecifické pre určitý typ tkaniva. Tieto molekuly sú oproti krátkym ncRNA slabo konzervované a dokážu regulovať expresiu génov viacerými mechanizmami, ktoré doteraz nie sú plne preskúmané.

To, že sú lncRNA slabšie uchovávané počas evolúcie naznačuje, že evolvujú rýchlo. Jedným vysvetlením by mohlo byť, že interagujú s limitovaným počtom cieľových sekvencií, čo by dovoľovalo zvýšenú variabilitu počas evolučného času. Druhou možnosťou je, že len krátke úseky lncRNA sa zúčastňujú týchto špecifických väzieb. Túto možnosť podporuje pozorovanie, že často sa v lncRNA vyskytujú kratšie oblasti s vysokou konzerváciou (Pang *et al.*, 2005).

Niektorí výskumníci podnikli pokusy pre klasifikáciu lncRNA. Väčšinou sa toto delenie zakladá na polohe lncRNA vzhľadom na kódujúcu sekvenciu.

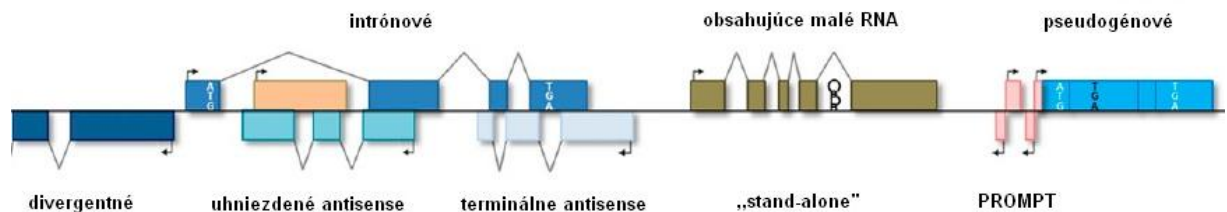
Jedno takéto delenie zahŕňa 5 typov lncRNA a to: (1) *sense* (na tom istom reťazci ako proteín kódujúci gén), (2) *antisense* (na opačnom reťazci), (3) obojsmerné (expresia lncRNA a kódujúceho génu na opačnom reťazci je iniciovaná <1000 bp od seba), (4) intrónové (lncRNA sa nachádza v rámci intrónov iného transkriptu), (5) intergénová (lncRNA leží medzi dvoma génmi, často označovaná ako tzv. lincRNA - *long intergenic ncRNA*), (obr. 2), (Ponting *et al.*, 2009; Yan *et al.*, 2012).



**Obr.2** Delenie lncRNA (Yan *et al.*, 2012; upravené).

O ďalšej klasifikácii by sa dalo povedať, že dopĺňa tú predošlú. Takisto zohľadňuje vzťah lncRNA k najbližšiemu proteín kódujúcemu génu, avšak trochu sa líši (Kung *et al.*, 2013). (1) Prvú skupinu tvoria osamotené lncRNA, alebo tzv. *stand-alone*, neprekrývajú sa so žiadnym kódujúcim génom, často sú práve medzi nimi a teda by sa dalo povedať, že sem patria lincRNA spomenuté vyššie. (2) Do druhej by sa potom radili antisense transkripty, rozlíšené na divergentné (žiadny stupeň prekrytia), uhniezdené („*nested*“) s vysokým prekrytím a

terminálne (čiastočné prekrytie). (3) Pseudogény sú nefunkčné relikty génov, ktoré stratili svoju funkciu. Časť z nich však býva transkribovaná. Exprimované pseudogény môžu byť nefunkčné vedľajšie produkty na svojej ceste za úplnou „pseudogenizáciou“. Druhou možnosťou je, že mohli nadobudnúť novú funkciu a stať sa tak lncRNA. O niektorých transkribovaných pseudogénoch je známe, že regulujú expresiu iných génov. (4) Ďalšou skupinou je lncRNA odvodená od intrónov, tak ako v delení vyššie. O intrónoch je dlhšie známe, že nesú malé ncRNA ako miRNA a snoRNA, nedávno však vyšlo najavo, že obsahujú aj dlhé nekódujúce transkripty. (5) Poslednú skupinu tvoria tzv. PROMPTs (*promoter upstream transcripts*). Sú prepisované veľmi zriedkavo (menej ako 1 kópia na bunku) a nie je úplne jasné, či majú nejakú funkciu, pretože sa zdá, že sú to iba vedľajšie produkty aktivity RNA polymerázy II (obr. 3). Ako to už pri mnohých klasifikáciách býva, jedna lncRNA môže spadať do viacerých tried.



**Obr.3** Doplnujúce delenie lncRNA (Kung *et al.*, 2013; upravené).

Obrovská väčšina identifikovaných lncRNA pochádza z jaderného genómu. Rackham *et al.* (2011) však objavili tieto molekuly aj v mitochondriálnom genóme. Konkrétne popísali tri: *lncND5*, *lncND6* a *lncCyt b*. Keďže boli komplementárne ku kódujúcim génom *ND5*, *ND6* a *Cyt b*, dostali podľa nich aj svoje názvy. Podobne ako jaderné lncRNA, vykazujú mitochondriálne lncRNA expresiu špecifickú pre daný typ tkaniva, pričom najhojnejšie sú ich počty vo vaječníkoch a semenníkoch.

## 2.3. Funkcia lncRNA

Dlhé nekódujúce RNA sa zúčastňujú rôznych biologických procesov v ktorých fungujú odlišnými mechanizmami. Ukazuje sa, že sú zapojené v regulácii génov, imprintingu, epigenetike, kontrole bunecného cyklu, transkripcii, translácii, bunkovej diferenciácii a ďalších.



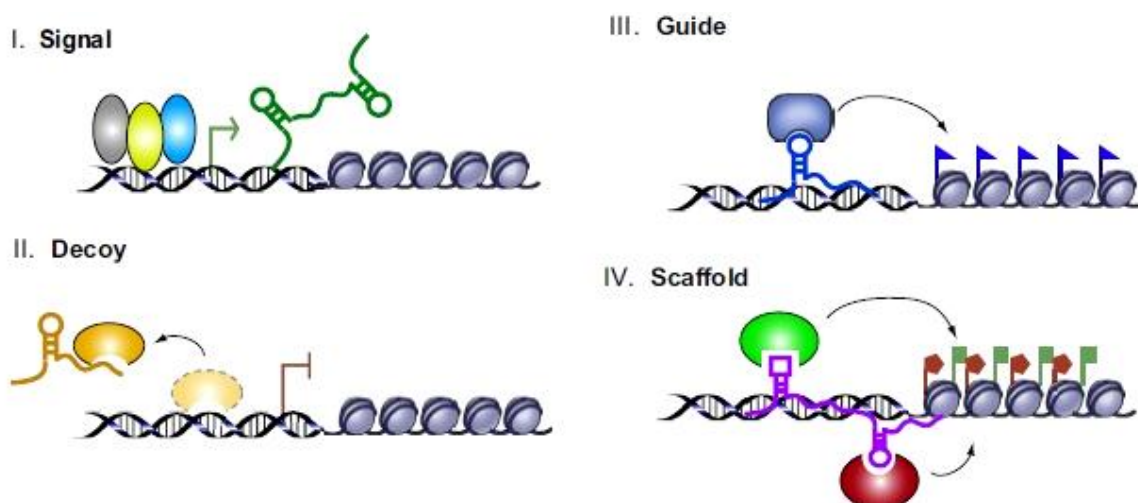
Wang s kolegami (2011) zatriedili mechanizmus pôsobenia lncRNA do 4 archetypov: *signal* (v prekl. signál), *decoy* (v prekl. návnada), *guide* (v prekl. sprievodca) a *scaffold* (v prekl. lešenie), (obr. 4).

1. „**Signal**“ - lncRNA môže slúžiť ako molekulárny signál, pretože ich transkripcia sa často vyskytuje v špecifickom štádiu vývoja organizmu. Dajú sa tak použiť ako markery biologických udalostí. LincRNA *RoR* býva vo veľkom exprimovaná pri preprogramovaní somatických buniek na indukované pluripotentné kmeňové bunky (iPSC), (Loewer *et al.*, 2010).

2. „**Decoy**“ - tento typ lncRNA naviaže proteín, ktorý je schopný viazať sa na RNA a „odvedie“ ho preč od jeho pôvodného cieľa. Napríklad lncRNA *GAS5* (*growth arrest-specific 5*) sa viaže na glukokortikoidový receptor (GR) a bráni tak expresii GR-indukovaných génov (Kino *et al.*, 2010).

3. „**Guide**“ - tu lncRNA podobne ako u „decoy“ naviaže proteín, ale naopak, k jeho cieľovému miestu naviazania ho dovedie. Takto môžu lncRNA ovplyvňovať expresiu blízkych (*in cis*) alebo vzdialených génov (*in trans*). Tu ako príklad poslúži *XIST*, ktorý viaže PRC2 (*polycomb repressive complex 2*), pomocou ktorého dochádza k útlmu expresie génov na neaktívnom X chromozóme (viď kap. 3.3).

4. „**Scaffold**“ - molekula lncRNA pôsobí ako tzv. lešenie alebo platforma, na ktorú sa naviažu molekuly, ktoré by inak mali problém dostať sa naraz na to isté miesto v tom istom čase. Napríklad lncRNA *HOTAIR* tvorí most medzi PRC2 (trimetylácia na H3K27), ktorý sa viaže na 5' koniec molekuly a LSD1/CoREST H3K4 demetylázovým komplexom, ktorý zas okupuje 3' koniec RNA (Tsai *et al.*, 2010).



**Obr.4** Funkcie lncRNA (Wang *et al.*, 2011; upravené).

Zdá sa však, že niekedy nemá funkciu transkript, ale samotná transkripcia lncRNA. Napríklad ak transkript vzniká v okolí promotora proteín kódujúceho génu, dokáže interferovať s jeho transkripčnými faktormi a zabrániť tak prepisu tohoto génu (Katayama *et al.*, 2005).

Ako bude aj ďalej v texte uvedené, lncRNA môžu slúžiť aj ako prekursor pre malé RNA.

### 3. LncRNA a kancerogéna

Čím viac sa vie o lncRNA, tým je čoraz jasnejšie, že ich deregulácia sa môže podieľať na vývoji rôznych ochorení. Najčastejšie bývajú skúmané práve v súvislosti s nádorovými ochoreniami. V niektorých prípadoch má nekódujúca RNA onkogénne vlastnosti, v iných zas naopak, slúži ako tumor supresor. V tabuľke nižšie sú vybrané niektoré lncRNA a typ nádoru, s ktorým súvisia (Tab.1).

Na lncRNA sa často viažu chromatín-modifikujúce komplexy ako PRC1 a PRC2. Komplex PRC1 zahŕňa Bmi1, mPh1/2, chromobox (CBX) a ubikvitín E3 ligázu RING1A/B, ktorá vnáša na histón 2A jeden ubikvitín (H2AK119ub1). PRC1 pomáha udržať útlm cieľových génov. PRC2 sa skladá zas z podjednotiek EED, Suz12 a metyltransferázy EZH1/2, ktorá katalyzuje trimetyláciu lyzinu 27 na históne H3 (H3K27me3). PRC2 sa podieľa na iniciácii represie génov (Aguilo *et al.*, 2011).

lncRNA	Funkcia	Typ nádoru	Fenotyp
<b><i>HULC</i></b>	biomarker	hepatocelulárny	neznámy
<b><i>PCA3</i></b>	biomarker	prostata	neznámy
<b><i>ANRIL</i></b>	onkogén	prostata, leukémia	supresia starnutia bunky
<b><i>HOTAIR</i></b>	onkogén	hepatocelulárny, nádor prsníka	podporuje proces tvorby metastáz
<b><i>MALAT-1</i></b>	onkogén	pľúca, prostata, prsník, hrubé črevo	nejasný
<b><i>PCGEM1</i></b>	onkogén	prostata	narúša apoptózu
<b><i>H19</i></b>	onkogén, tumor supresor	hepatocelulárny, prsník	podporuje rast a proliferáciu bunky
<b><i>GAS5</i></b>	tumor supresor	prsník	indukuje apoptózu a zastavenie rastu
<b><i>MEG3</i></b>	tumor supresor	hepatocelulárny, meningióm, leukémia	sprostredkovanie signalizácie p53

**Tab.1** Príklady lncRNA v nádoroch (Prensner *et al.*, 2011; upravené).

### 3.1. MEG 3

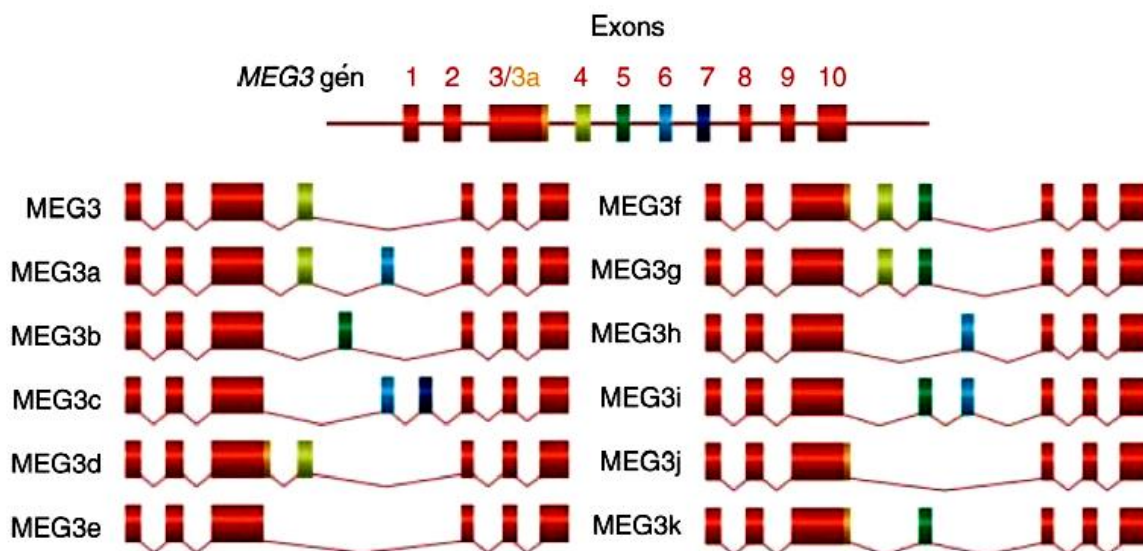
*MEG3* (*maternally expressed gene 3*) je imprintovaný gén patriaci k regiónu DLK1-MEG3 lokalizovanom v oblasti 14q32 na chromozóme 14 u ľudí. *Meg3* na lokuse Gtl2 na chromozóme 12 je jeho myšiu ortológ.

*MEG3* tvorí asi 1600 nt dlhý transkript, ktorý nemá žiadny významný otvorený čítací rámec (ORF) takže sa neprekladá do proteínu. Tento transkript má 12 izoforiem, každá sa vyznačuje odlišným alternatívnym zostrihom. Je exprimovaný v mnohých zdravých tkanivách, pričom jeho expresia býva znížená alebo úplne stratená vo viacerých tumoroch, preto sa predpokladá, že patrí medzi tumor supresorové gény. Kontrola expresie sa spája s prinajmenšom dvoma odlišne metylovanými oblasťami - DMR (*differentially methylated regions*): IG-DMR (*intergenic*) a MEG3-DMR.

*MEG3* interaguje s proteínom p53, cyklickým AMP a GDF15 (*growth differentiation factor 15*), ktorý hrá rolu v kontrole bunkového cyklu.

#### 3.1.1. MEG3 izoformy

Izoformy *MEG3* sú pomenované ako *MEG3*, *MEG3a* až *MEG3k*. Gén obsahuje 10 exónov, exóny 1-3 a 8-10 sú spoločné pre všetky izoformy, líšia sa odlišnou kombináciou exónov 3a, 4-7 (obr. 5).

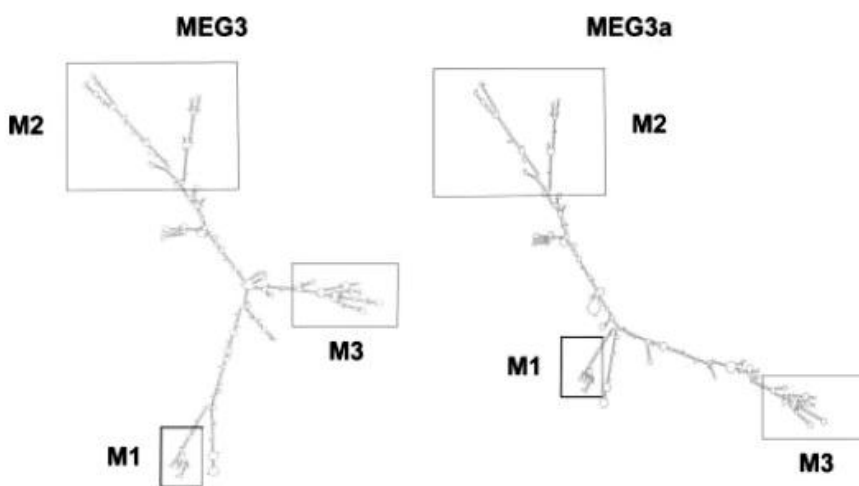


**Obr.5** Izoformy *MEG3* (Zhou *et al.*, 2012; upravené).

Vo viacerých vzorkách tkanív (hypofýza, bunky fetálnej pečene, fibroblasty, bunky nadobličiek a bunky z tumoru hypofýzy) bola sledovaná expresia jednotlivých foriem génu. Zistilo sa, že v každej zo vzoriek je najviac exprimovaná prvá forma - *MEG3* (40-86% zo všetkých), zároveň sa ukázalo, že len v bunkách fetálnej pečene je exprimovaná každá z izoformiem.

Ďalej bola v štúdiu skúmaná ich schopnosť zvyšovať p53-sprostredkovanú aktiváciu génov a schopnosť potlačiť delenie buniek. Pre všetky izoformy boli typické obe funkcie. Spomedzi nich sa ako najsilnejšie aktivátory p53-sprostredkovanej iniciácie génov ukázali *MEG3e* a *MEG3i*, ktorých účinok bol v priemere asi 5-krát silnejší než účinok izoformiem s najslabšou schopnosťou aktivácie (*MEG3a*, *MEG3f* a *MEG3h*). Delenie buniek boli schopné potlačiť jednotlivé izoformy približne rovnako (Zhang *et al.*, 2010).

Pomocou programu *mfold* Zhang *et al.* (2010) zistili, že každá *MEG3* izoforma mala tri konzervované štruktúrne motívy M1, M2 a M3 (obr.6). Význam jednotlivých motívov sa testoval tak, že boli pripravené *MEG3* mutanty, pričom v každom z nich bol odstránený jeden motív a bola pozorovaná schopnosť stimulovať aktivitu p53. Delécia M1 znížila túto schopnosť približne o 30%, delécia M3 o 67% a pri delécii M2 stimulácia takmer vymizla v porovnaní s kontrolou.



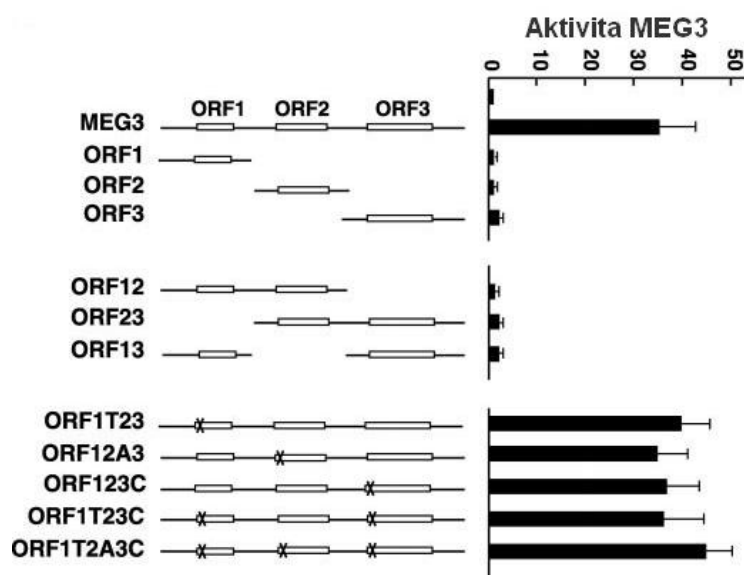
**Obr.6** Predpokladaná sekundárna štruktúra *MEG3* a *MEG3a* (Zhang *et al.*, 2009; upravené).

### 3.1.2. Mechanizmus pôsobenia

Proteín p53 funguje ako významný transkripčný faktor schopný regulovať expresiu mnohých génov. *MEG3* dokáže stabilizovať množstvo p53 vďaka tomu, že znižuje expresiu MDM2 (*mouse double minute 2*), ubikvitín ligázy, ktorá degraduje p53 (Zhou *et al.*, 2007).

Tým, že sa zníži množstvo MDM2, neprebehne rýchla degradácia proteínu p53, takže sa hromadí.

Zhou *et al.* (2007) ďalej skúmali, či je pre stimuláciu p53 nutná translácia *MEG3*. Vybrali si tri z niekoľkých malých ORF, ktoré *MEG3* obsahuje a ktoré kódujú hypotetické peptidy s počtom aminokyselinových zvyškov väčším ako 50. Označili ich ako ORF1-3. Na začiatku vytvorili mutantné *MEG3* transkripty, ktoré neboli kompletne, pretože obsahovali časti sekvencií v oblasti jedného alebo dvoch z uvedených ORF (ORF1, ORF2, ORF3, ORF12, ORF13, ORF23). Aktivita týchto neúplných transkriptov bola prudko znížená. Ďalším krokom bolo vytvorenie mutantných *MEG3*, ktoré tvorili kompletne transkripty, avšak vždy obsahovali jeden alebo dva ORF neschopné podstúpiť transláciu (ORF1T23, ORF12A3, ORF123C, ORF1T2A3, ORF1T2A3C). Aktivita takýchto *MEG3* molekúl bola porovnateľná s divokým typom *MEG3* (obr.7). Ukázalo sa, že funkcia *MEG3* nevyžaduje jej transláciu, ale nepoškodený transkript.



**Obr.7** *Ľavá časť:* schématické znázornenie *MEG3* mutantov (križik značí bodovú mutáciu, kvôli ktorej nedochádza k translácii daného ORF). *Pravá časť:* nameraná aktivita *MEG3* (Zhou *et al.*, 2007; upravené).

V tej istej štúdii sa zistilo, že *MEG3* zvyšuje expresiu niektorých cieľových génov proteínu p53 tým, že stimuluje väzbu p53 na ich promotor. V bunkách do ktorých bol vložený *MEG3* sa zvýšila expresia *GDF15*, pričom expresia proteínu p21 zostala nezmenená, z čoho vyplýva, že *GDF15* je cieľovým génom *MEG3*, zatiaľčo p21 nie.

*MEG3* dokáže taktiež inhibovať bunecnú proliferáciu aj v prípade absencie p53. Experimenty boli robené na bunkách nádoru hrubého čreva. Časť buniek bola upravená tak, že neexprimovala proteín p53 a časť áno. V oboch vzorkách vznikal transkript *MEG3* a v

oboch došlo k inhibícii delenia. Znova, v bunkách, v ktorých nevznikal celý *MEG3*, k inhibícii nedošlo. Z toho vyplýva, že *MEG3* dokáže brániť proliferácii aj pri nedostatku proteínu p53 (Zhou *et al.*, 2007).

Samotná expresia *MEG3* býva stimulovaná pomocou cyklického AMP. Ako sa zistilo postupnými deléciami na promotore *MEG3*, väzbové miesto pre cAMP, tzv. CRE (*cAMP response element*) sa nachádza na pozícii medzi -69 a -49. Ukázalo sa, že CRE je kritické pre aktivitu promotora, pretože keď sa vytvorila mutovaná verzia promotora, ktorá mala namiesto sekvencie TGACGTCA (divoký typ CRE) sekvenciu GCGGCCGC, aktivita bola výrazne znížená. Medzi rôznymi živočíšnymi druhmi je táto sekvencia konzervovaná, čo naznačuje jej funkčný význam (Zhao *et al.*, 2006).

cAMP stimuluje transkripciu *MEG3* cez aktiváciu proteínov rodiny CREB (*CRE binding protein*), ktoré sa viažu na CRE ako dimér. CREB potom aktivuje CBP (*CREB binding protein*) a ten dokáže indukovať transkripciu buď interakciou s RNA polymerázou II alebo pomocou svojej acetylázovej aktivity. Transkripcia všetkých izoforiem je regulovaná tým istým promotorom.

### 3.1.3. *MEG3* v nádoroch

Strata *MEG3* expresie bola zaznamenaná v mnohých tumoroch postihujúcich napr. mozog, močový mechúr, kostnú dreň, hrubé črevo, pečeň, pľúca alebo prostatu (Zhou *et al.*, 2012).

Ako bolo uvedené vyššie, *MEG3* býva exprimovaná v zdravých tkanivách, najmä v hypofýze a mozgu. Zhao *et al.* (2005) skúmali tri vzorky tkaniva zdravej hypofýzy a 14 vzoriek nádoru. V každej zo zdravých vzoriek bola pomocou RT-PCR dokázaná expresia *MEG3*, no 13 zo 14 nádorových tkanív nepreukazovalo žiadnu *MEG3* expresiu.

Zistili, že nedostatočná expresia nebola spôsobená stratou heterozygotnosti, deléciou alebo mutáciami, ale hypermetyláciou promotora. Ten je totiž bohatý na CpG dinukleotidy (celkovo ich obsahuje 112). U zdravej hypofýzy je väčšina týchto CpG nemetylovaná, u nádorov je to presne naopak.

Na bunkách z bunkovej línie nádoru prsníka, ktoré *MEG3* neexprimujú bol testovaný účinok inhibítora metylácie 5-aza-2'-deoxycytidínu. Po pridaní inhibítora bola *MEG3* detekovaná (Zhao *et al.*, 2005).

U pacientov s hematologickými malignitami ako je akútna myeloidná leukémia alebo myelodysplastický syndróm bola hypermetylácia DMR u *MEG3* spájaná s nižším celkovým prežitím (Benetatos *et al.*, 2009).

## 3.2. *H19*

Z historického pohľadu je *H19* prvým identifikovaným imprintovaným nekódujúcim transkriptom. Nachádza sa na lokuse 11p15.5 (*H19/IGF2*). Je dlhý asi 2300 nt a exprimovaný z materskej alely. Opačne k nemu, z toho istého lokusu, z paternálnej alely je exprimovaný gén *IGF2* (*insuline-like growth factor 2*).

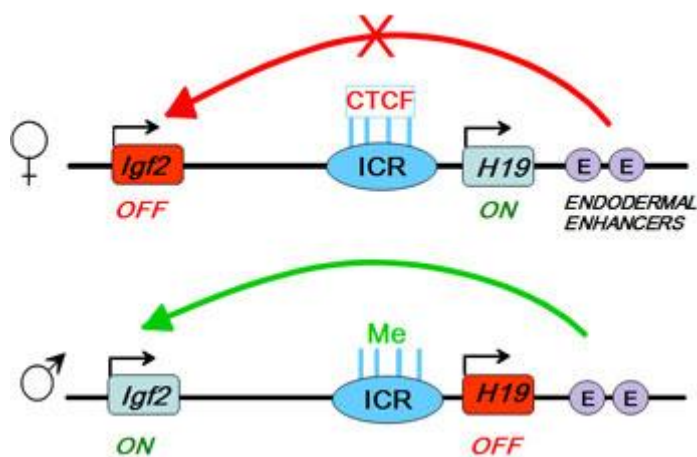
*H19* je onkofetálny gén, prevažne transkribovaný počas embryogenézy u stavovcov a vo väčšine tkanív sú po narodení jeho hladiny výrazne znížené.

*H19* obsahuje vyše 35 malých ORF, pričom najväčší z nich, nazvaný ORF5 kóduje potenciálny proteín o dĺžke 132 aminokyselín.

Pri porovnaní ľudského a myšieho génu *H19* bola zistená identita 77%, pričom bolo zaujímavé, že medzi druhmi nebol nájdený žiadny konzervovaný ORF. Prípadné proteíny z génu *H19* by boli u človeka a myši odlišné (Brannan *et al.*, 1990).

### 3.2.1. Lokus

Expresia na lokuse *H19/IGF2* býva kontrolovaná pomocou rozdielne metylovaných regiónov (DMR, alebo aj inak nazývanými ICR - *imprinting control regions*). ICR lokalizovaný asi 2 kb od 5' konca promotora *H19* kontroluje zároveň expresiu génu *H19* aj *IGF2* (obr.8).

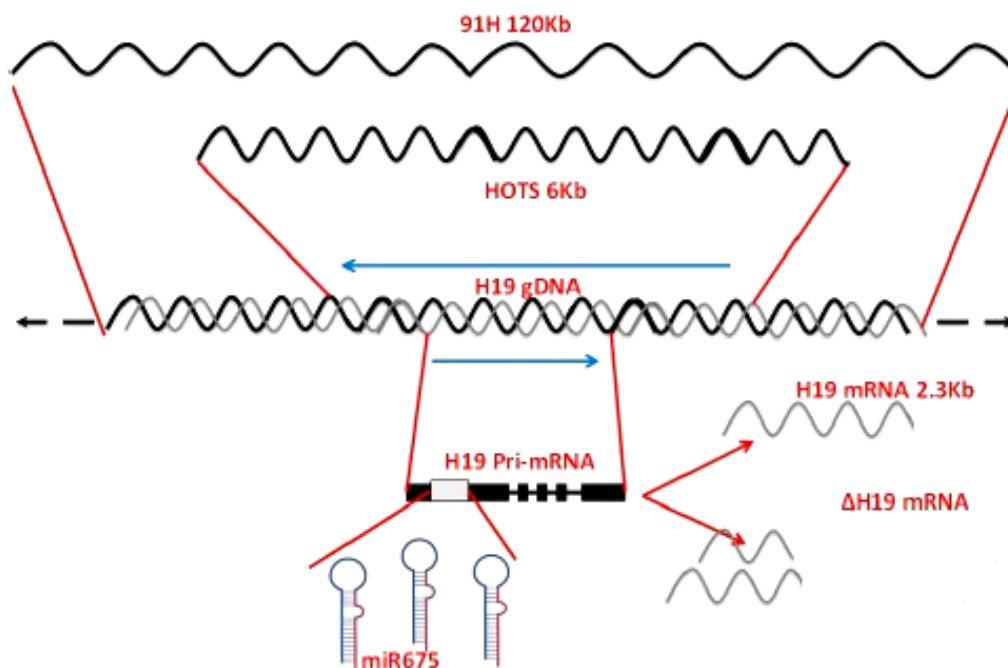


**Obr.8** *H19/IGF2* lokus (Wallace *et al.*, 2007; upravené).

Ak sa na materskej alele, ktorá je v oblasti ICR nemetylovaná, naviaže CTCF proteín (*CCTC-binding factor*), *IGF2* sa neprepisuje, zatiaľ čo *H19* áno.

Na otcovskej alele dochádza k opačnej situácii. ICR je metylovaný, CTCF sa nenaviaže, takže sa *H19* neprepisuje a enhancery na 3'konci stimulujú transkripciu *IGF2*.

Samotná oblasť lokusu, na ktorej sa nachádza gén *H19* sa vyznačuje vysokou komplexitou (obr.9). Z reťazca, z ktorého sa prepisuje lncRNA *H19*, zároveň vzniká aj microRNA *miR-675*, 23 nt dlhý transkript. Cai *et al.* (2007) vo svojej štúdií ukázali, že *H19* môže slúžiť ako primárny microRNA prekursor u človeka aj myši. Opačný reťazec (*antisense*) dáva vznik RNA, ktorá kóduje proteín HOTS (*H19 opposite tumor suppressor*) a 120 kb dlhému transkriptu *91H*.



**Obr.9** Oblasť lokusu *H19* (Matouk *et al.*, 2013; upravené).

*HOTS* patrí takisto medzi imprintované gény a podobne ako *H19* sa exprimuje z materskej alely. *HOTS* je pomerne dobre konzervovaný medzi primátmi, ale nie u myši, ktorá nemá preňho žiadny ORF. Predpokladá sa, že by mohol slúžiť ako tumor supresor, pretože u niekoľkých prípadov Wilmsovho tumoru bola zistená jeho nižšia expresia.

*91H* je RNA, ktorá sa nachádza prevažne v jadre (viac ako 80%) narozdiel od *H19*, ktorej podiel v jadre a cytoplazme býva porovnateľný (Berteaux *et al.*, 2008). *91H* je relatívne málo stabilná, takže u zdravých buniek boli detekované len jej malé množstvá. U buniek z viacerých vzoriek rakoviny sa akumuluje, pretože dochádza k stabilizácii transkriptu. Obzvlášť diskutovaný býva jej nadbytok v tkanivách rakoviny prsníka.

*miR-675* vzniká z exónu 1 génu *H19*. Táto microRNA má vo svojej štruktúre slučku a slúži ako templát pre dve rozdielne formy: *miR-675-5p* a *miR-675-3p*. Za normálnych podmienok



zabraňuje u človeka proliferácii trofoblastov počas embryogenézy, aby tak nedošlo k nadmernému rastu (Cai *et al.*, 2007).

Z izoforiem samotnej *H19*, ktoré vznikajú alternatívnym zostrihom je známa varianta, ktorej chýba časť exónu 1 alebo varianta bez exónu 4 (Matouk *et al.*, 2004).

### 3.2.2. Mechanizmus pôsobenia

Hypoxia v nádorovom tkanive podporuje proces angiogenézy, rozvoj nádoru a vznik metastáz. Zistilo sa, že hypoxia zvyšuje hladinu lncRNA *H19* v jadre, avšak táto odpoveď na nedostatok kyslíka značne závisí na stave tumor supresorového génu p53 (Matouk *et al.*, 2007, Matouk *et al.*, 2010). Experimenty boli robené na 28 bunkových líniiach, z ktorých 9 malo plne funkčný gén kódujúci proteín p53 (p53<sup>wt</sup>). Na žiadnej z týchto línii, okrem línie buniek MCF7 (vysvetlené nižšie), nebola indukovaná transkripcia *H19*. Bunky, u ktorých p53 nevznikal vôbec (p53<sup>null</sup>), ako napr. bunky z nádoru pečene alebo pľúc u človeka, naopak, vykazovali vysoký stupeň indukcie *H19*. Rozličné množstvo *H19* bolo namerané u vzoriek s rozdielnymi mutáciami v géne p53 (p53<sup>mut</sup>).

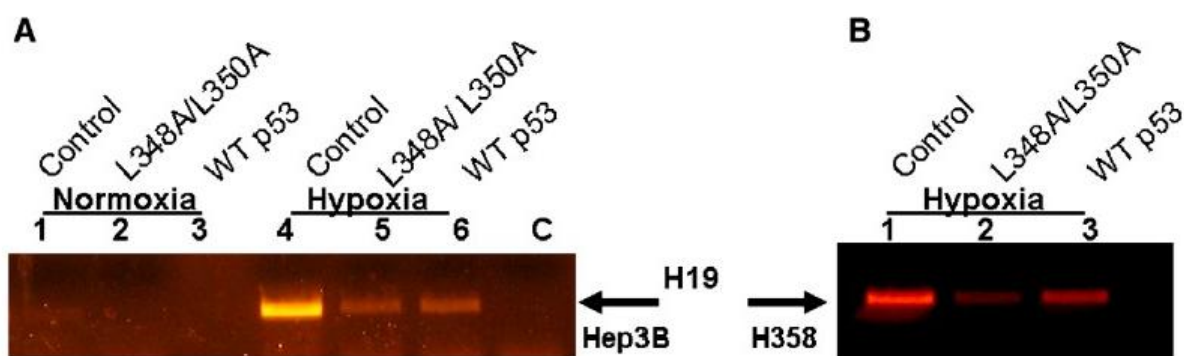
Aby sa skutočne potvrdilo, že zvýšenie hladiny *H19* pri hypoxii závisí na stave p53, boli bunky p53<sup>null</sup> (rak. línie Hep3B a H358) transfektované plazmidom nesúcim funkčný gén p53. Po transfekcii došlo u buniek k výraznému zníženiu hladín *H19*.

Ďalej sa zisťovalo, kde v bunkách dochádza k supresorovej aktivite p53 na *H19* pri hypoxii. Gén p53 obsahuje vysoko konzervovanú sekvenciu NES (*nuclear export sequence*), ktorá je dôležitá pre export p53 z jadra do cytoplazmy. Boli vytvorené bunky (znova použité línie Hep3B a H358) s dvojitou mutáciou L348A a L350A v sekvencii NES, ktoré sa vyznačovali lokalizáciou proteínu p53 len v jadre (p53<sup>NES-</sup>). Pomocou RT-PCR analýz bolo zistené, že v oboch líniiach mal proteín p53<sup>NES-</sup> porovnateľnú účinnosť ako p53<sup>wt</sup> (obr.10), z čoho sa usudzuje, že k potlačeniu indukcie *H19* dochádza práve v jadre. Ako bolo spomenuté vyššie, línia MCF7 tvorila výnimku, pretože hoci mala p53<sup>wt</sup>, došlo u nej aj tak k miernej indukcii *H19* a to práve preto, že u MCF7 je väčšina proteínu p53 vylúčená z jadra do cytoplazmy (Matouk *et al.*, 2010).

Zámerná redukcia množstva *H19* pomocou dvoch siRNA, ktoré sa viazali na rozdielne miesta *H19* vyústila u buniek A549 (karcinóm pľúc) a Hep3B pri hypoxii k zníženej životaschopnosti (Matouk *et al.*, 2010).

Matouk *et al.* (2010) popísali, že hlavným faktorom u hypoxie, ktorý indukuje tvorbu *H19* je HIF1- $\alpha$ . Do buniek línie Hep3B p53<sup>null</sup> boli ešte pred spustením hypoxie transfekciou vložené siRNA, ktorých cieľom bol práve HIF1- $\alpha$ . Dve z troch siRNA účinne znižovali

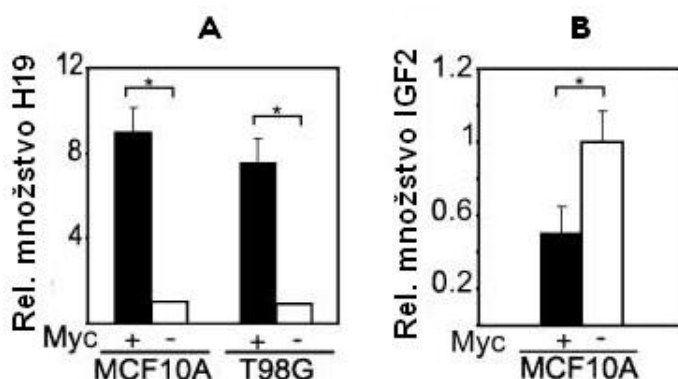
množstvo HIF1- $\alpha$ . U buniek, v ktorých sa nachádzala jedna z dvoch účinných siRNA nedochádzalo k indukcii *H19*.



**Obr.10 A:** línia Hep3B transfektovaná p53<sup>wt</sup> (prúžok 3 a 6), p53<sup>NES-</sup> s mutáciou L348A a L350A (prúžok 2 a 5) a prázdny vektorom ako kontrolou (1,4). **B:** línia H358 transfektovaná p53<sup>wt</sup> (3), p53<sup>NES-</sup> (2) a kontrolou (1); (Matouk *et al.*, 2010; upravené).

Jedným z najvýznamnejších transkripčných faktorov *H19* je *c-myc*. *C-myc* patrí do rodiny Myc a jeho expresia býva deregulovaná vo viacerých typoch rakoviny. Spolu so svojim partnerom Max vytvárajú heterodimér *c-Myc-Max* a v tejto podobe sa viažu na DNA sekvenciu.

Aby sa otestovalo, či *c-myc* naozaj reguluje expresiu *H19*, Baryte-Lovejoy *et al.* (2006) vyvolali ektopickú expresiu *c-myc* v bunkách MCF10A a T98G (bunky glioblastómu). Znova pomocou RT-PCR bolo zistené 7 až 10- násobné zvýšenie expresie génu *H19* (obr.11A). Línia MCF10A bola použitá aj na zistenie vplyvu *c-myc* na expresiu *IGF2*. Z výsledkov vyplynulo, že *c-myc* zvyšuje expresiu *H19* a znižuje ju v prípade génu *IGF2* (obr.11B).



**Obr.11** Expresia *H19* a *IGF2* v bunkách s (+) a bez *c-myc* (-); (Baryte-Lovejoy *et al.*, 2006; upravené).

C-myc sa viaže priamo na E-boxy (*enhancer-box*) promotora *H19*, blízko ICR a reguluje iba jednu alelu s génom *H19* a to tú, z ktorej sa *H19* aktívne prepisuje (Barsyte-Lovejoy *et al.*, 2006). Po vystavení buniek inhibítora DNA metylácie AzaC, je c-myc schopný viazať sa a indukovať *H19* z oboch alel.

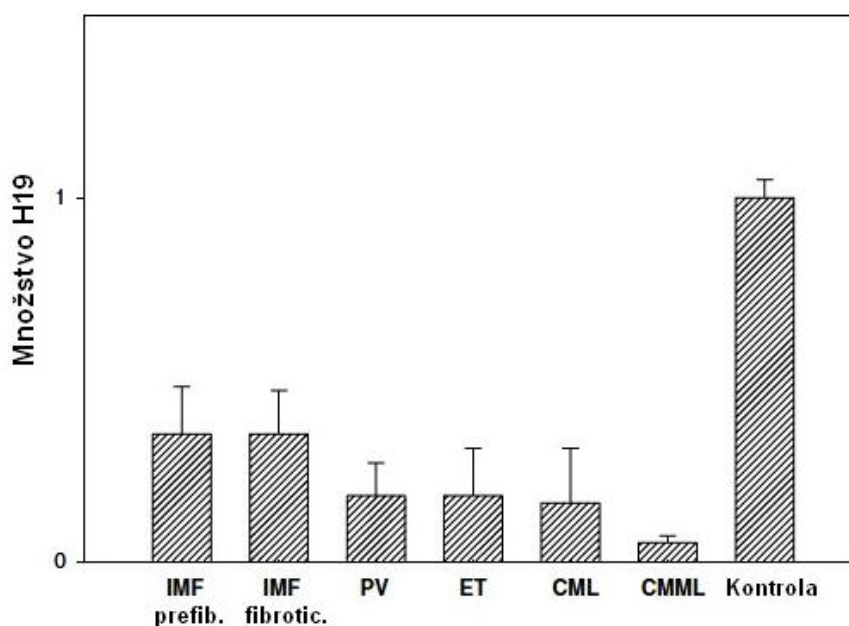
V rovnakej štúdií sa prišlo na to, že princíp indukcie spočíva v tom, že c-Myc-Max privolajú histón acetyltransferázy (HAT), ktoré aktivujú promotor *H19*. Použitie inhibítora histón deacetyláz (HDAC) TSA v bunkách bez c-Myc (*myc*<sup>-/-</sup>) malo totiž za následok takisto zvýšenú expresiu *H19*.

Napriek tomu, ako často sa spomína rola *H19* ako potenciálneho onkogénu, pri pokusoch na myšiach *in vivo* sa lncRNA *H19* správala ako tumor supresor. U myší sa *H19* nachádza na chromozóme 7 a gén je takisto exprimovaný z materskej alely a *Igf2* z otcovskej.

Výsledky z pokusov s kolorektálnym karcinómom na myšiach ukázali, že počet adenómov bol asi 2,2-krát vyšší pri absencii *H19*, než v jej prítomnosti. Obe skupiny myší mali deléciu v géne *Apc*, čo reprezentovalo myší model pre kolorektálny karcinóm. Jedna skupina mala funkčný gén *H19* (*wt*), druhá v ňom mala deléciu veľkú približne 3 kb (*H19Δ3*). Expresia *Igf2* sa medzi *wt* a *H19Δ3* nelíšila. Yoshimizu *et al.* (2008) predpokladajú, že *H19* by tak mohla kontrolovať iniciáciu tvorby tumoru. Pri experimentoch s nádorom pečene zas výsledky naznačovali rýchlejší rozvoj tumoru pri strate expresie *H19*.

V štúdií zároveň autori uvádzajú, že obojaká tvár génu *H19* (onkogén / tumor supresor), môže byť spôsobená rozdielmi medzi jednotlivými organizmami človek-myš a že je teda možné, že lokus s génom *H19* má u človeka oveľa komplexnejšiu funkciu (Yoshimizu *et al.*, 2008).

Spomenuté informácie sa týkajú solidných nádorov, pokiaľ však ide o nádory nesolidné, bola zistená výrazná redukcia tvorby *H19* v hematopoietických ochoreniach (obr.12) ako leukémie, polycytémia vera alebo trombocytémia (Bock *et al.*, 2003, Nuñez *et al.*, 2000). Počas normálnej hematopoiézy vzniká z jednej alely *H19* a z druhej *IGF2*, keďže ide o imprintovaný gén. Tzv. strata imprintigu (LOI - *loss of imprinting*) sa našla v polovici prípadov akútnej myeloidnej leukémie (Wu *et al.*, 1997) a v prípadoch pokročilej chronickej myeloidnej leukémie (Randhawa *et al.*, 1998). Dochádza tam totiž k bialelickej expresii *IGF2* a teda redukcii *H19*. V prípade nesolidných nádorov by tak *H19* mohla slúžiť ako tumor supresor.



**Obr.12** Expresia *H19* počas normálnej hematopoiézy (kontrola) a chronických myeloproliferatívnych chorôb (IMF - idiopatická myelofibróza, PV - polycytémia vera, ET - esenciálna trombocytémia, CML - chronická myeloidná leukémia, CMML - chronická myelomonocytická leukémia); (Bock *et al.*, 2002; upravené).

### 3.3. *XIST*

Gén *XIST* (*X inactive specific transcript*) bol popísaný už v roku 1991 Brownovou a kolegami (Brown *et al.*, 1991, Brown *et al.*, 1992). Je to približne 17 kb dlhý transkript, ktorý vzniká z génu nachádzajúcom sa na chromozóme X na lokuse XIC (X-inaktivačné centrum). Má dôležitú úlohu v inaktivácii jedného z X chromozómov u cicavcov (Penny *et al.*, 1996) a tvorbe Barrovho telieska. Zásadne sa prepisuje len na neaktívnom X chromozóme, kde sa akumuluje a tvorí zhuk.

Voľba chromozómu X, ktorý bude inaktívovaný je u človeka a somatických buniek myši náhodná, hoci v myších extraembryonálnych tkanivách (placenta) sa preferuje inaktivácia X chromozómu pochádzajúceho od otca (Takagi *et al.*, 1975).

#### 3.3.1. Lokus

XIC obýva 100-500 kb veľkú doménu na X chromozóme a obsahuje niekoľko nekódujúcich génov, z ktorých najvýznamnejšie sú *XIST*, *TSIX*, *RepA* a *Jpx*. (obr.13) Je to zároveň miesto, od ktorého začína inaktivácia a šíri sa oboma smermi.



**Obr.13** Lokus Xic - centrum inaktivácie X chromozómu (Jeon *et al.*, 2011; upravené).

*XIST* teda vzniká na neaktívnom chromozóme X (*Xi*) a interaguje s transkripčnými faktormi ako sú CTCF, PRC2 a proteínom YY1. PRC2 dokáže účinne tlmiť transkripciu génov pomocou metylácie K27H3 (lyzín 27 na históne 3).

*TSIX* sa nachádza na opačnom vlákne DNA ako *XIST*, tvorí lncRNA dlhú okolo 40 kb a dokáže tiež reagovať s PRC2. Narozdiel od *XIST*u ale vzniká na aktívnom X chromozóme (*Xa*). Negatívne reguluje *XIST*.

*RepA* je súčasť *XIST*u. Ten pozostáva z niekoľkých tandemových repetícií, z ktorých najdôležitejšia a zároveň evolučne najkonzervovanejšia je práve *RepA* (*Repeat A*) na 5' konci.

*Jpx* (alebo *Enox* - *expressed neighbor of Xist*) je pozitívny regulátor *XIST*u, nachádza sa od neho asi 10 kb upstream.

### 3.3.2. Mechanizmus pôsobenia

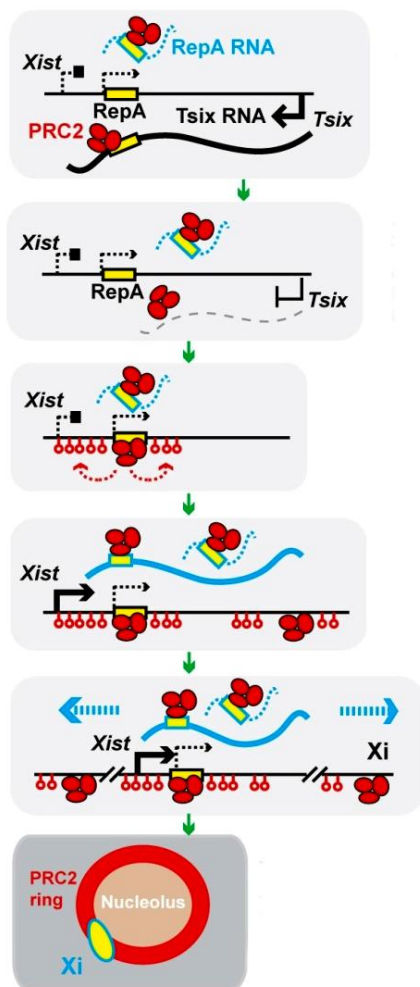
*TSIX* má funkciu represora pre *XIST*, čo bolo dokázané u myších embryí (Sado *et al.*, 2005). Inaktivácia maternálneho X chromozómu vyvolaná narušením génu pre *Tsix* (myši ortológ) viedla k smrti embryí oboch pohlaví krátko po implantácii (ako bolo spomenuté, extraembryonálne tkanivá myši majú *Xa* maternálneho pôvodu a *Xi* paternálneho a teda v týchto bunkách došlo k inaktivácii oboch X). Ak sa ale na tomto maternálnom chromozóme X s narušeným *Tsix*om narušil aj gén pre *Xist*, embryá prežili, pretože mali funkčný *Xa*.

Ďalej embryá ženského pohlavia, ktoré zdedili X s dvojitou mutáciou od otca (narušený *Xist* aj *Tsix*) uhynuli kvôli neschopnosti inaktivácie imprintovaného X chromozómu. Pokiaľ ale zdedili tento chromozóm od matky, boli životaschopné.

Aby vôbec mohlo dôjsť k inaktivácii X chromozómu, musí sa na *Xist* naviazať komplex PRC2. *Xist* následne šíri inaktiváciu pozdĺž chromozómu práve pomocou tohto komplexu, ktorý tlmi gény na *Xi* (Engreitz *et al.*, 2013).

Zhao *et al.* (2008) zistili, že pre naviazanie komplexu PRC2 na gén *Xist* ešte pred samotnou inaktiváciou X chromozómu je najdôležitejší región *RepA*. Dokázali, že *RepA* je schopný naviazať PRC2 aj pri ektopickej expresii na jednom z autozómov nezávisle od *Xistu*,

konkrétne na podjednotku Ezh2 (*Enhancer of zeste 2*). Zároveň sa však na PRC2 dokáže viazať aj *Tsix* a teda na *Xa* bráni väzbe *RepA*-PRC2. Postup je znázornený na obrázku (obr.14).



1. *Tsix* a *RepA* súťažia o naviazanie PRC2.

2. Na budúcom Xi je potlačená tvorba *Tsix* a PRC2 sa viaže na *RepA*.

3. PRC2 metyluje *Xist* na H3K27 (červená značka).

4. *Xist* je aktivovaný, viaže a šíri PRC2 *in cis*.

5. Inaktivácia X chromozómu.

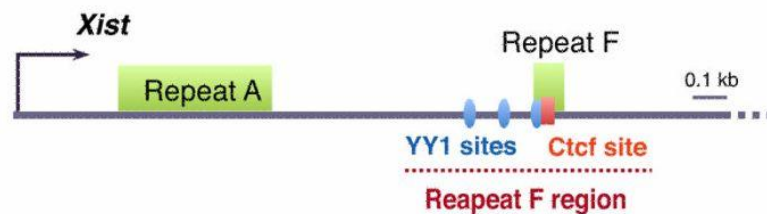
6. Počas S-fázy viaže Xi PRC2 do perinukleolárneho priestoru.

**Obr.14** Inaktivácia X chromozómu pomocou naviazania PRC2 na *RepA* (Zhao *et al.*, 2008; upravené).

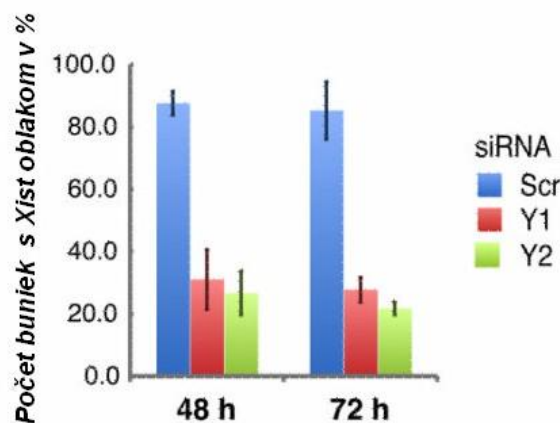
Zatiaľ čo *Tsix* je negatívny regulátor, *Jpx* reguluje *Xist* pozitívne. Robí to tak, že naviaže CTCF (transkripčný represor, spomenutý aj pri *H19*), ktorý bráni transkripcii *Xistu* a nedovolí mu naviazať sa na *Xist*, takže nedôjde k jeho represii. Ženské embryonálne bunky sú veľmi citlivé na zvýšenú expresiu CTCF. Po diferenciácii vykazovali bunky so zvýšenou expresiou CTCF rôzne defekty rastu a oblaky *Xistu* boli nájdené len u asi 7-8% prípadoch (oproti 40% buniek u ktorých nebola indukovaná nadmerná expresia CTCF), (Sun *et al.*, 2013).

Keď sa však k tomu zvýšila expresia *Jpx*, defekty boli zvrátené a *Xist* transkripty znova detekovateľné. Tieto výsledky ukazujú, že množstvo *Xistu* závisí od rovnováhy medzi CTCF a *Jpx*.

V nesposlednom rade vyvstala otázka, ako je zhluk *Xist* transkriptov prichytený na Xi. Jeon *et al.* (2011) si položili otázku, či exón 1 z transkriptu je postačujúci na to, aby sa *Xist* udržal na Xi. Po tom, ako sa ukázalo, že exón 1 naozaj stačí, hľadali sa na ňom potenciálne väzbové miesta pre proteíny. Našli dve pre CTCF a YY1 (obr.15). Narušením CTCF v ženských bunkách MEF (*mouse embryonic fibroblasts*) sa neukázala žiadna redukcia v množstve *Xist* oblakov. Porušenie YY1 však viedlo k strate *Xist* oblakov u viac ako 70% buniek MEF. Podobné výsledky vyšli pri použití Y1 alebo Y2 YY1- špecifickej siRNA (obr.16). Z toho vyplýva, že pre umiestnenie *Xistu* na Xi je nevyhnutná prítomnosť YY1, čo je vlastne proteín schopný viazať DNA aj RNA a vďaka tomu dokáže medzi nimi vytvoriť spojenie.



**Obr.15** Znárodnenie väzbových miest pre YY1 a CTCF na *Xiste* (Jeon *et al.*, 2011; upravené).



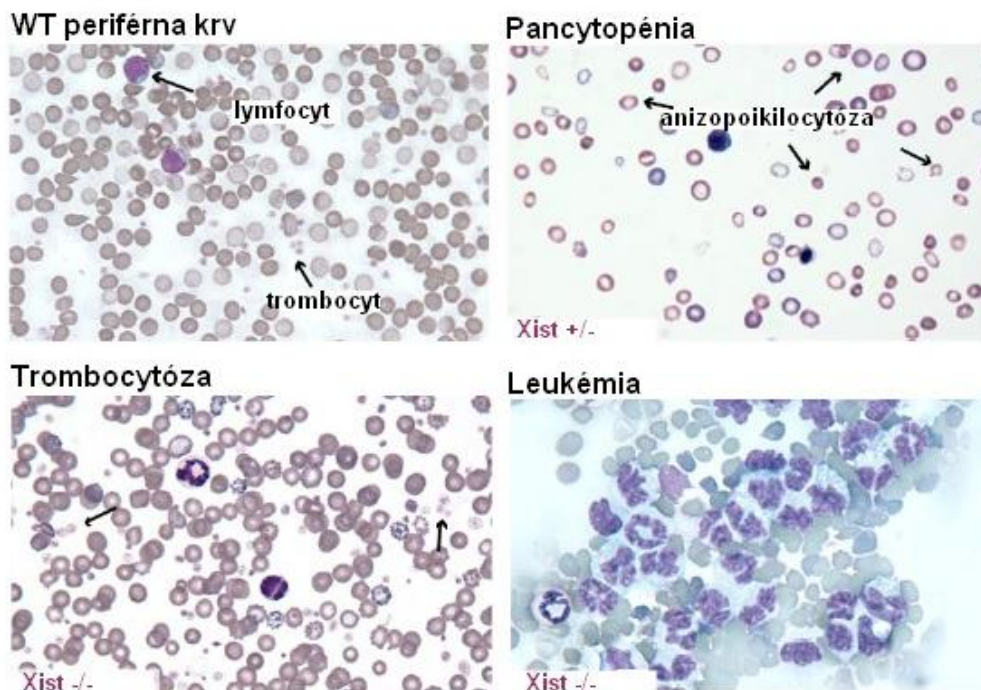
**Obr.16** Množstvo buniek s *Xist* oblakom sa výrazne zredukovalo pri použití siRNA Y1 a Y2 oproti kontrole (Scr), (Jeon *et al.*, 2011; upravené).

### 3.3.3. *XIST* v nádoroch

Tak ako väčšina lncRNA aj defekty v expresii *XISTu* sú spájané s nádorových ochorením, či hematologickými malignitami.

Sirchia s kolegami napríklad zistili, že *XIST* sa chová netradične v bunkách rakoviny prsníka (Sirchia *et al.*, 2009). V línii, ktorú skúmali (MCF7) chýbal Xi, zo 700 testovaných jadier nenašli Barrovo teliesko ani v jednom. Bunky MCF7 majú dva aktívne chromozómy X, vzniknuté po duplikácii pôvodného Xa (zistenie na základe pozorovania vysokej hladiny homozygotnosti medzi chromozómami), ale zároveň aj *XIST*, ktorý vznikol práve z aktívneho X. Po zvýraznení *XIST*u a X chromozómov v týchto bunkách a následnom prekrytí získaných obrázkov sa ukázalo, že *XIST* nedokáže stabilne pokryť Xa, pretože sa často nachádzal mimo teritória X chromozómov.

Ako sa zdá, *XIST* má rolu tumor supresora pokiaľ ide o nádorové ochorenia hematopietických buniek. *In vivo* pokusy na myšiach ukázali, že po delécii celého génu *Xist* u samičiek došlo k hyperproliferácii všetkých hematopietických línii, obzvlášť však myeloidnej. U týchto samičiek dochádzalo k zväčšeniu sleziny a rôznym dysplastickým zmenám cirkulujúcich buniek. Pozorovaná bola napríklad leukocytóza, trombocytóza, pancytopénia, leukémia, poikilocytóza a ďalšie (obr.17). Pri delécii *Xistu* zároveň došlo k reaktivácii chromozómu Xi (Yildirim *et al.*, 2013).



**Obr.17** Hematologické malignity po delécii *Xistu* na jednom (+/-) a dvoch X chromozómoch (-/-), (Yildirim *et al.*, 2013; upravené).



### 3.4. MALAT-1

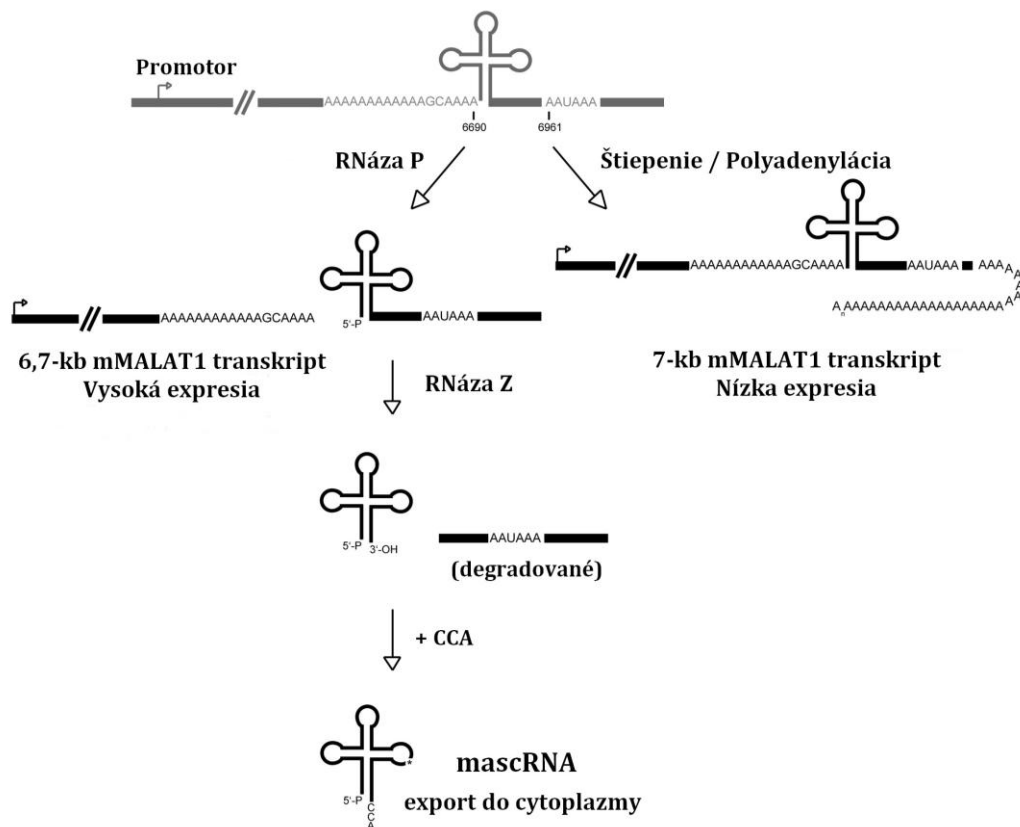
Medzi prvými objavenými dlhými nekódujúcimi RNA sa nachádza aj *MALAT-1* (*Metastasis Associated in Lung Adenocarcinoma Transcript 1*) s alternatívnym názvom *NEAT2* (*Nuclear-Enriched Abundant Transcript 2*). Pôvodne bol *MALAT-1* známy pod názvom  $\alpha$ -gén. Ji *et al.* (2003) tento transkript premenovali práve kvôli úzkemu súvisu s metastázami u nádoru pľúc.

Vysoko konzervovaný transkript dlhý viac ako 8 kb vzniká z chromozómu 11q13.1. Nachádza sa v jadre, konkrétne v tzv. *nuclear speckles*, malých jaderných štruktúrach, ktorých hlavnou funkciou je uchovávať faktory podieľajúce sa na alternatívnom zostrihu. Zvyčajne sa ich v bunke nachádza okolo 20 až 30.

*MALAT-1* býva spájaný so zvýšeným rizikom metastatickej aktivity a to obzvlášť u adenokarcinómu pľúc, ale aj nádoru kolorekta.

#### 3.4.1. Forma

*MALAT-1* dáva vznik malej, vysoko konzervovanej molekule podobnej tRNA, *mascRNA* (*MALAT1-Associated Small Cytoplasmic RNA*). *MascRNA* vzniká skracovaním 3' konca *MALAT-1* dvoma RNázami (obr.18).



**Obr.18** Vznik mascRNA (Wilusz *et al.*, 2008; upravené).

Najprv RNáza P štípe transkript na dve časti, vzniká 6,7 kb dlhý *MALAT-1* a časť, ktorá obsahuje *mascRNA*. Z tej je potom ešte odštiepená a následne degradovaná časť 3' konca. K takto upravenému 3' koncu sa ešte pridajú tri nukleotidy CCA a vznikne kompletná, 61 nt dlhá *mascRNA*, ktorá je exportovaná do cytoplazmy.

*MascRNA* sa narozdiel od *MALAT-1* nachádza v cytoplazme, má výrazne kratšiu dobu života a zrejme aj odlišnú biologickú funkciu, ktorá nie je úplne jasná, ale predpokladá sa, že by *mascRNA* mohla slúžiť ako vnútrobunkový signál, ktorý dá ostatným štruktúram bunky vedieť o vzniku *MALAT-1* transkriptu bez toho, aby bol exportovaný samotný *MALAT-1* (Wilusz *et al.*, 2008).

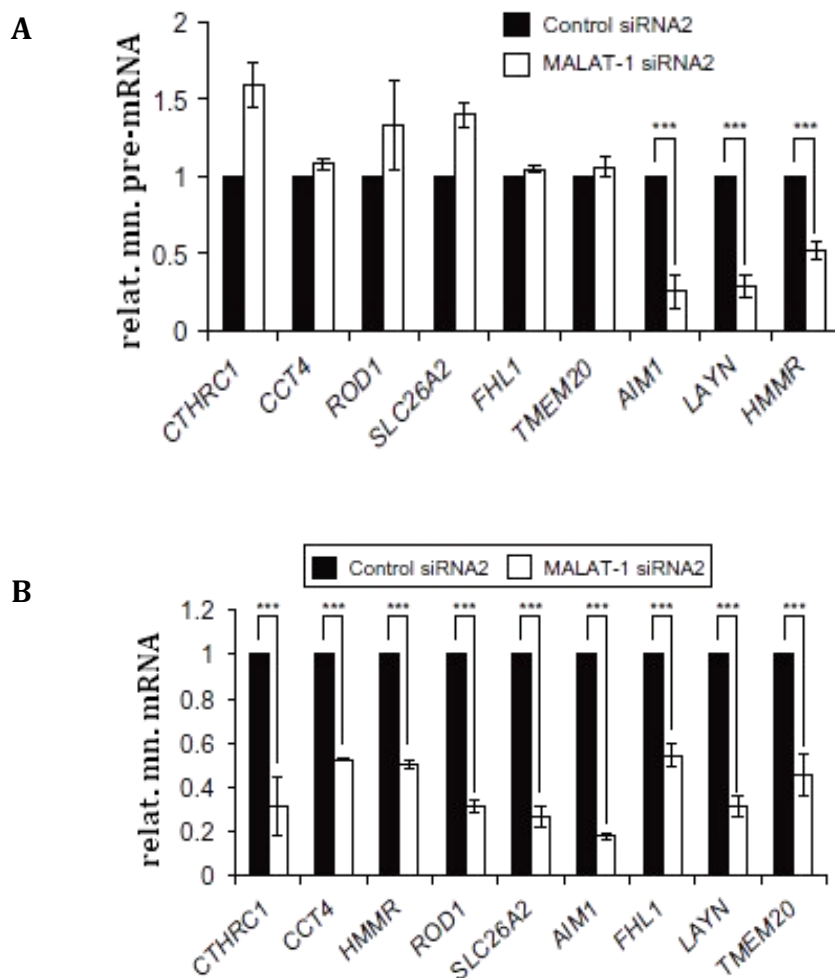
### 3.4.2 Mechanizmus pôsobenia

Medzi funkcie *MALAT-1* v bunke patrí pozitívna regulácia pohyblivosti buniek a vplyv na alternatívny zostrih.

Čo sa týka alternatívneho zostrihu (AS), je efekt *MALAT-1* stále predmetom diskusií. V štúdií z roku 2010 sa uvádza, že *MALAT-1* reguluje AS pomocou zmeny pomeru fosforylovaných SR proteínov k nefosforylovaným. Tie sú dôležité práve pri AS. Zníženie *MALAT-1* viedlo k posunu pomeru v prospech defosforylovaných SR proteínov, ktorých množstvo sa tak zvýšilo (Tripathi *et al.*, 2010).

V novšom článku, z roku 2013, sa však nezistil žiadny vplyv *MALAT-1* na AS, či na fosforyláciu faktorov zostrihu. Rozdiely by mohli byť spôsobené napríklad použitím rozdielnych typov buniek. Zatiaľ čo v tomto experimente bola použitá línia HeLa, v predchádzajúcom boli bunky z adenokarcinómu pľúc (Gutschner *et al.*, 2013).

Informácie o pôsobení *MALAT-1* na pohyb buniek sú o niečo jasnejšie. Pri skúmaní efektu úbytku *MALAT-1* na bunkovú migráciu, proliferáciu a adhéziu, Tano *et al.* (2010) zistili, že schopnosť proliferovať, a adhézia buniek sa nijak významne nezmenili. Výsledky naznačovali, že rola tejto RNA spočíva v migrácii. S použitím DNA čipovej analýzy porovnali expresiu génov u *MALAT-1* KD (*knock down*) a kontroly. Medzi génmi so zníženou expresiou u vzorky *MALAT-1* KD sa nachádzali napríklad *CTHRC1* (*collagen triple helix repeat containing 1*) sekretovaný proteín, podporuje migráciu bunky a inhibuje expresiu kolagénu, alebo *CCT4* (*chaperonin-containing tailless complex polypeptide, subunit 4*), ktorý je zahrnutý v skladaní tubulínu, aktínu a iných proteínov cytoplazmy. Niektoré z týchto génov boli ovplyvnené na úrovni transkripcie (*LAYN*, *HMMR*) iné posttranskripčne - množstvá pre-mRNA neboli znížené (*CTHRC1*, *CCT4*). Pre porovnanie slúžia obrázky 19A a 19B.



**Obr.19 A:** Množství pre-mRNA. **B:** Množství mRNA génov (Tano *et al.*, 2010; upravené).

Fakt, že má *MALAT-1* významnú funkciu pre pohyblivosť buniek zároveň znamená, že je potencionálne dôležitý pre proces metastázy, obzvlášť u pľúcneho adenokarcinómu, ako vyplýva aj z názvu molekuly.

Karcinóm pľúc patrí medzi časté nádorové ochorenia a NSCLC (*non-small cell lung cancer*) predstavuje asi 80% prípadov všetkých nádorov pľúc. Po kompletom odstránení nádoru v skorých štádiách je zvyčajne prognóza dobrá. Avšak, u niektorých pacientov sa zvyknú rozvinúť vzdialené metastázy. U týchto metastatických pacientov je expresia *MALAT-1* zvýšená v priemere asi 3,2-krát (Ji *et al.*, 2003).

Výskumy na myšiach, ktorým boli injikované bunky ľudského adenokarcinómu pľúc tieto tvrdenia potvrdzujú. Kontrolná skupina myší (WT - *wild type*) bola porovnaná s dvoma nezávislými bunecnými líniami, u ktorých bola expresia *MALAT-1* výrazne redukovaná. V kontrolnej skupine myší sa vyvinulo v priemere o 87% metastáz menej (Gutschner *et al.*, 2013).

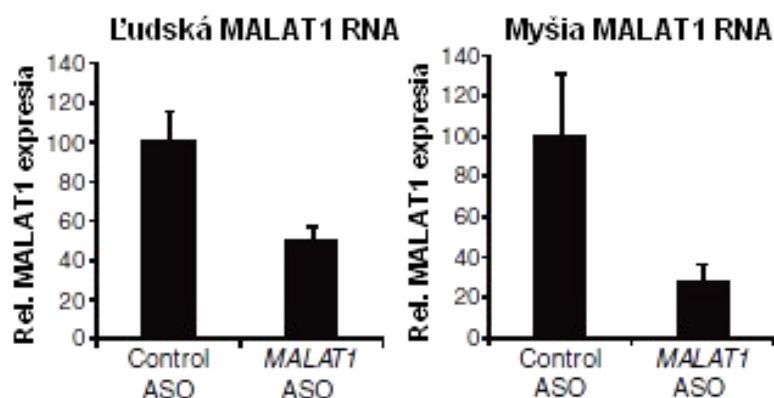
Okrem NSCLC je *MALAT-1* nadmerne exprimovaný aj v iných typoch nádorov, ako napr. kolorektálny karcinóm (CRC), nádor endometria, hepatocelulárny karcinóm.

Pri skúmaní transkriptu u CRC, sa naklonovalo 5 rôznych fragmentov, ktoré dohromady boli schopné pokryť celú dĺžku *MALAT-1*. V experimente bola docielená nadmerná expresia jednotlivých fragmentov tak, aby samotný *MALAT-1* vykazoval nízku expresiu. Bunky, ktoré exprimovali posledný fragment (6918 - 8441 nt, 3' koniec transkriptu) proliferovali najrýchlejšie. Autori uvádzajú, že v tomto poslednom fragmente je zahrnutá sekvencia pre *ascRNA* a teda, že to naznačuje, že nesie zrejme významnú funkciu (Xu *et al.*, 2011).

Naopak v hematologických malignitách, ako je napríklad myelodysplastický syndróm, je expresia *MALAT-1* nižšia (Isin *et al.*, 2014). Uvádza sa, že by to mohlo mať za následok práve aberantný zostrih niektorých génov.

U myši sa však ukazuje, že úplná strata *Malat1* (myši ortológ) je zlúčiteľná so životom. Eissmann *et al.* (2012) dostali krížením heterozygotných myši (*Malat1*<sup>+/-</sup>) myši homozygotné (*Malat1*<sup>-/-</sup>), ktoré boli *Malat1*-deficientné vo všetkých svojich tkanivách. Napriek tomu sa narodili živé a pri normálnych, nestresových podmienkach nevykazovali žiadny viditeľný patologický fenotyp.

Zníženie množstva transkriptu sa dá dosiahnuť aj pomocou tzv. ASO (*antisense oligonukleotids*). Gutschner s kolegami (2013) testovali špeciálne navrhnuté ASO, ktoré dokázali naviazať myši aj ľudský *MALAT-1* a blokovať ho. Autori injikovali ľudské bunky NSCLC myšiam a aplikovali ASO (50 mg/kg, 5x do týždňa, 5 týždňov). V porovnaní s kontrolou zistili, že ASO účinne znížilo hladiny funkčného transkriptu *in vivo* (obr.20). Cílený úbytok *MALAT-1 in vivo* by tak mohol pomôcť v prevencii proti metastázam.



**Obr.20** Hladiny *MALAT-1* po podaní ASO (Gutschner *et al.*, 2013; upravené).

### 3.5. ANRIL

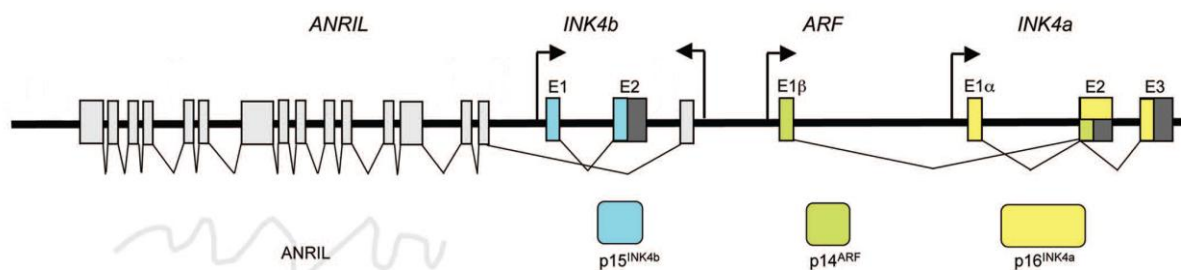
*ANRIL* (*antisense non-coding RNA in the INK4 locus*) je jednou z pomerne nedávno objavených lncRNA. Jej alternatívne názvy sú *CDKN2B-AS1* (*CDKN2B antisense RNA 1*) a *p15AS* (*p15 antisense RNA*). Nachádza sa na chromozóme číslo 9 v oblasti 9p21 na lokuse INK4b-ARF-INK4a (CDKN2A/B), kde sa nachádzajú významné tumor supresorové gény a ktorý bude popísaný nižšie.

Na *ANRIL* sa viažu komplexy PRC1 a PRC2, pomocou ktorých tento lokus reguluje. Najdlhšia a najčastejšie popisovaná varianta tejto lncRNA je dlhá 3834 bp a pozostáva z 19 exónov.

Mutácie na *ANRIL*e alebo zmeny expresie bývajú spájané s viacerými chorobami ako napr. Alzheimerova choroba, kardiovaskulárne problémy, endometrióza, periodontitída, a niekoľkými typmi nádorových ochorení ako leukémia, melanóm, karcinóm prsníka, pankreasu, či glióm.

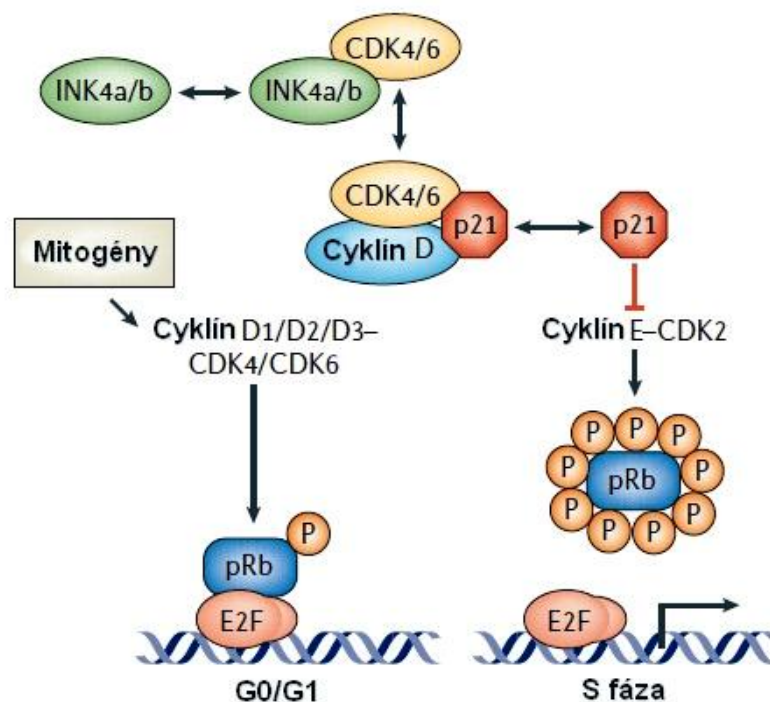
#### 3.5.1. Lokus

INK4b-ARF-INK4a lokus (niekedy skracovaný na INK4-ARF) má rozsah približne 35 kb a nachádzajú sa na ňom 3 kódujúce gény - *INK4a*, *ARF*, *INK4b* - a na opačnom reťazci *ANRIL* (obr.21).



**Obr.21** Lokus INK4b-ARF-INK4a (Popov *et al.*, 2010; upravené).

Produkty génov *INK4b* (*p15*) a *INK4a* (*p16*) fungujú ako inhibítory cyklín-dependentných kináz (CDK), ktoré zabezpečujú postup bunky z G1 fázy do fázy S. Konkrétne sa viažu na CDK4 a CDK6 a blokujú tak tvorbu komplexu cyklín D-CDK. Normálne po jeho vzniku nasleduje vznik ďalších komplexov cyklín-CDK a fosforylácia pRb, ktorý tak uvoľňuje transkripčný faktor E2F a ten zas aktivuje prepis svojich génov podieľajúcich sa na progresii bunkového cyklu. INK4b-ARF-INK4a lokus sa teda podieľa na proliferácii a starnutí bunky (schématické zobrazenie - obr.22), (Gil *et al.*, 2006; Popov *et al.*, 2010).



**Obr.22** Schématické znázornenie úlohy *INK4a/b* v postupe bunkového cyklu z fázy G1 do S (Gil *et al.*, 2006; upravené).

Na druhej strane, *ARF* (*p14*) je zahrnutý v aktivácii p53 pomocou inhibície MDM2, ktorý degraduje p53.

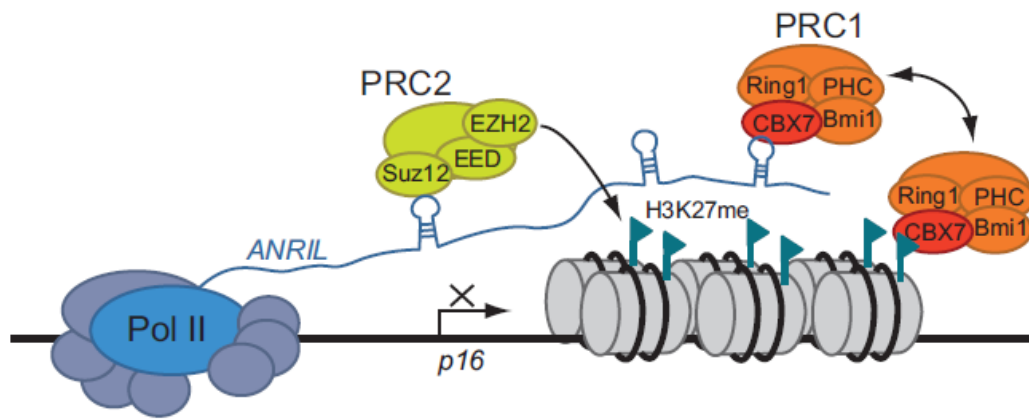
Všetky tri gény sú v mladých a zdravých bunkách exprimované v nízkych hladinách, ale akumulujú sa počas starnutia alebo pri stimulácii onkogénmi (Kotake *et al.*, 2011).

Čo sa týka štruktúry lokusu, *INK4a* a *ARF* zdieľajú časti druhého a tretieho exónu, ale sú transkribované z nezávislých promotorov. Odtiaľ je aj názov *ARF* - *alternative reading frame*.

Samotný *ANRIL* je k uvedeným génom prepisovaný z opačného reťazca, konkrétne je *antisense* ku génu *INK4b*, ktorého alternatívny názov je *CDKN2B* alebo *p15*, preto sa aj *ANRIL* niekedy nazýva *CDKN2B-AS1*, či *p15AS*.

### 3.5.2. Mechanizmus pôsobenia

Všeobecne prevládajúci názor na mechanizmus *ANRIL*u je, že slúži ako tzv. lešenie („*scaffold*“, vid' kap. 2.3.) pre molekuly komplexov PRC1 a PRC2 (obr.23), ktoré po naviazaní na lokus tlmia transkripciu génov. Z toho vyplýva, že ak bude expresia *ANRIL*u vysoká, expresia génov z lokusu bude nízka a naopak (Yap *et al.*, 2010; Yu *et al.*, 2007; Kotake *et al.*, 2011).



**Obr.23** Model represie INK4b-ARF-INKa lokusu (Yap *et al.*, 2010; upravené).

Vplyv *ANRIL*u na transkripciu *INK4a* bol potvrdený pomocou pokusov na diploidných fibroblastoch (lína IMR-90). Tie boli transdukované retrovírusom exprimujúcim buď *ANRILas-4* alebo *ANRILas-1*. Oba transkripty sú antisense k *ANRIL*u, pričom *ANRILas-4* je rozsiahlejší. Tieto antisense transkripty spôsobili zvýšenie expsie *INK4a*. Zvýšenie *INK4b* bolo menej výrazné (Yap *et al.*, 2010).

Kotake *et al.* (2011) takisto testovali účinok *ANRIL*u na gény tohto lokusu. Podobne ako v predchádzajúcej štúdií, experimenty boli robené na fetálnych fibroblastoch pochádzajúcich z pľúc (lína WI38). Navrhli krátky úsek RNA, ktorý sa špecificky viazal na exón 1. Po redukcii množstva *ANRIL*u došlo k 8-násobnému zvýšeniu expsie *INK4b*, zatiaľ čo zvýšenie *INK4a* bolo nepatrné (1,8-krát). Rozdiely na efektu *ANRIL*u na gény *INK4a* a *INK4b* môžu byť spôsobené rozdielmi medzi jednotlivými líniami.

Väzbu PRC1 na *ANRIL* skúmali Yap *et al.* (2010). Všimli si zvýšenú expresiu *ANRIL*u v tkanivách karcinómu prostaty a tomu odpovedajúci úbytok v expresii *INK4a* oproti preneoplastickým a normálnym tkanivám. Zároveň však spozorovali zvýšené množstvá CBX7 (súčasť PRC1) a Ezh2 (súčasť PRC2). Autori potvrdili, že PRC1 vytvára stabilný komplex s *ANRIL*om ale nie anti-*ANRIL* transkriptom. Po použití RNázy A sa obsadenie lokusu molekulami z komplexu PRC1 (CBX7, Bmi1) a PRC2 (Suz12) dramaticky znížilo, čo svedčí o tom, že bez *ANRIL*u sa PRC1 na lokus nenaviaže.

Testovaná bola aj väzba PRC2-*ANRIL*. Redukcia *ANRIL*u aj komplexu PRC2 viedla k zvýšenej expresii *INK4a* aj *INK4b*. To vyvolalo otázku, či je *ANRIL* potrebný pre väzbu PRC2 na lokus. Útlm *ANRIL*u spôsobil zníženie obsadenia Suz12 (časť PRC2) na lokuse, pričom stabilné množstvo proteínu Suz12 v bunke sa nezmení. Suz12 tvorí imunokomplex s *ANRIL*om, ktorý tak premostuje priepasť medzi DNA a PRC komplexami (Kotake *et al.*, 2011).

Vzhľadom na to, že *ANRIL* kontroluje funkciu génov *INK4* a tie zas kontrolujú bunkový cyklus, je zrejmé, že ak dôjde k mutácii tejto lncRNA, dôjde aj k patologickým zmenám v bunke. Génových aberácií a SNP zasahujúcich *ANRIL* bolo identifikovaných hneď niekoľko. Napríklad SNP rs3731217 v oblasti 9p21.3 zvyšuje riziko vzniku akútnej lymfatickej leukémie (ALL), choroby, ktorá je v západných krajinách najrozšírenejším nádorovým ochorením detského veku. Štúdie potvrdili asociáciu rs3731217 s ALL u rôznych národností (Nemecko, Španielsko, Maďarsko, Kanada), (Sherborne *et al.*, 2010). U ALL sú často deletované aj väčšie časti *INK4b-ARF-INKa* lokusu a to buď mono- alebo bialelické. U normálnych kmeňových hematopoietických buniek je lokus epigeneticky tlmený. Delécia na lokuse u ALL, obzvlášť s Filadelfským chromozómom (Iacobucci *et al.*, 2011), má však za následok zvýšenie agresivity ochorenia a oslabuje odpoveď na cieleňú liečbu (Williams *et al.*, 2008).



## 4. Záver

Dlhé nekódujúce RNA sú pomerne novou témou v molekulárnej biológii. Výskumy však ukazujú, že majú veľký regulačný potenciál pre proteín-kódujúce gény. To znamená, že sa podieľajú na rôznych dôležitých bunkových procesoch od proliferácie až po diferenciáciu.

Táto práca bola zameraná na dereguláciu lncRNA v nádorových ochoreniach, ktoré sú jednou z najväčších hrozieb modernej civilizácie. Na piatich príkladoch bola ukázaná rola lncRNA vo vývoji nádorov. Ukazuje sa totiž, že niektoré lncRNA majú onkogénne vlastnosti (*MALAT-1*, *ANRIL*), zatiaľ čo iné (*MEG3*) fungujú ako tumor supresory.

Keďže je expresia lncRNA časovo aj priestorovo špecifická, môžu tak tieto molekuly slúžiť ako markre. Jednak nás dokážu informovať o prebiehajúcich biologických udalostiach (expresia *XISTu* pri inaktivácii X chromozómu), alebo môžu poukázať na to, že v bunke dochádza k patologickým zmenám. V tomto prípade môžeme hovoriť aj o ich terapeutickom potenciále. Perspektívna sa ukazuje inaktivácia onkogénnych lncRNA. Napríklad zníženie množstva transkriptu *MALAT-1* pomocou špeciálne navrhnutých antisense oligonukleotidov by mohlo v budúcnosti pomôcť pri znížení metastatickej aktivity.

Na druhej strane, u lncRNA s tumor supresorovými schopnosťami by mohla byť génová terapia zameraná na doručenie lncRNA s výhodnými vlastnosťami do buniek.

Aby sa však tieto hypotézy potvrdili, sú nutné ďalšie výskumy v oblasti dlhých nekódujúcich RNA.

## Literatúra

- Aguilo, F., Zhou, M.M. & Walsh, M.J.** 2011. Long noncoding RNA, polycomb, and the ghosts haunting INK4b-ARF-INK4a expression. *Cancer Res*, 71(16):5365-5369.
- Barsyte-Lovejoy, D., Lau, S.K., Boutros, P.C., Khosravi, F., Jurisica, I., Andrulis, I.L., Tsao, M.S. & Penn, L.Z.** 2006. The c-Myc oncogene directly induces the H19 noncoding RNA by allele-specific binding to potentiate tumorigenesis. *Cancer Res*, 66(10):5330-5337.
- Benetatos, L., Hatzimichael, E., Dasoula, A., Dranitsaris, G., Tsiara, S., Syrrou, M., Georgiou, I. & Bourantas, K.L.** 2010. CpG methylation analysis of the MEG3 and SNRPN imprinted genes in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndromes. *Leuk Res*, 34(2):148-153.
- Berteaux, N., Aptel, N., Cathala, G., Genton, C., Coll, J., Daccache, A., Spruyt, N., Hondermarck, H., Dugimont, T., Curgy, J.J., Forné, T. & Adriaenssens, E.** 2008. A novel H19 antisense RNA overexpressed in breast cancer contributes to paternal IGF2 expression. *Mol Cell Biol*, 28(22):6731-6745.
- Bock, O., Schlué, J. & Kreipe, H.** 2003. Reduced expression of H19 in bone marrow cells from chronic myeloproliferative disorders. *Leukemia*, 17(4):815-816.
- Brannan, C.I., Dees, E.C., Ingram, R.S. & Tilghman, S.M.** 1990. The product of the H19 gene may function as an RNA. *Mol Cell Biol*, 10(1):28-36.
- Brown, C.J., Ballabio, A., Rupert, J.L., Lafreniere, R.G., Grompe, M., Tonlorenzi, R. & Willard, H.F.** 1991. A gene from the region of the human X inactivation centre is expressed exclusively from the inactive X chromosome. *Nature*, 349(6304):38-44.
- Brown, C.J., Hendrich, B.D., Rupert, J.L., Lafrenière, R.G., Xing, Y., Lawrence, J. & Willard, H.F.** 1992. The human XIST gene: analysis of a 17 kb inactive X-specific RNA that contains conserved repeats and is highly localized within the nucleus. *Cell*, 71(3):527-542.
- Cai, X. & Cullen, B.R.** 2007. The imprinted H19 noncoding RNA is a primary microRNA precursor. *RNA*, 13(3):313-316.
- Eißmann, M., Gutschner, T., Hämmerle, M., Günther, S., Caudron-Herger, M., Groß, M., Schirmacher, P., Rippe, K., Braun, T., Zörnig, M. & Diederichs, S.** 2012. Loss of the abundant nuclear non-coding RNA MALAT1 is compatible with life and development. *RNA Biol*, 9(8):1076-1087.

- Engreitz, J.M., Pandya-Jones, A., McDonel, P., Shishkin, A., Sirokman, K., Surka, C., Kadri, S., Xing, J., Goren, A., Lander, E.S., Plath, K. & Guttman, M.** 2013. The Xist lncRNA exploits three-dimensional genome architecture to spread across the X chromosome. *Science*, 341(6147):1237973.
- Gil, J. & Peters, G.** 2006. Regulation of the INK4b-ARF-INK4a tumour suppressor locus: all for one or one for all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 7(9):667-677.
- Gutschner, T., Hämmerle, M., Eissmann, M., Hsu, J., Kim, Y., Hung, G., Revenko, A., Arun, G., Stentrup, M., Gross, M., Zörnig, M., MacLeod, A.R., Spector, D.L. & Diederichs, S.** 2013. The noncoding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res*, 73(3):1180-1189.
- Iacobucci, I., Sazzini, M., Garagnani, P., Ferrari, A., Boattini, A., Lonetti, A., Papayannidis, C., Mantovani, V., Marasco, E., Ottaviani, E., Soverini, S., Girelli, D., Luiselli, D., Vignetti, M., Baccarani, M. & Martinelli, G.** 2011. A polymorphism in the chromosome 9p21 ANRIL locus is associated to Philadelphia positive acute lymphoblastic leukemia. *Leuk Res*, 35(8):1052-1059.
- Isin, M., Ozgur, E., Cetin, G., Erten, N., Aktan, M., Gezer, U. & Dalay, N.** 2014. Investigation of circulating lncRNAs in B-cell neoplasms. *Clin Chim Acta*, 431:255-259.
- Jeon, Y. & Lee, J.T.** 2011. YY1 tethers Xist RNA to the inactive X nucleation center. *Cell*, 146(1):119-133.
- Ji, P., Diederichs, S., Wang, W., Böing, S., Metzger, R., Schneider, P.M., Tidow, N., Brandt, B., Buerger, H., Bulk, E., Thomas, M., Berdel, W.E., Serve, H. & Müller-Tidow, C.** 2003. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene*, 22(39):8031-8041.
- Katayama, S., Tomaru, Y., Kasukawa, T., Waki, K., Nakanishi, M., Nakamura, M., Nishida, H., Yap, C.C., Suzuki, M., Kawai, J., Suzuki, H., Carninci, P., Hayashizaki, Y., Wells, C., Frith, M., Ravasi, T., Pang, K.C., Hallinan, J., Mattick, J., Hume, D.A., Lipovich, L., Batalov, S., Engström, P.G., Mizuno, Y., Faghihi, M.A., Sandelin, A., Chalk, A.M., Mottagui-Tabar, S., Liang, Z., Lenhard, B., Wahlestedt, C., Group, R.G.E.R., Group, G.S.G.G.N.P.C. & Consortium, F.** 2005. Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science*, 309(5740):1564-1566.
- Kino, T., Hurt, D.E., Ichijo, T., Nader, N. & Chrousos, G.P.** 2010. Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal*, 3(107):ra8.

- Kotake, Y., Nakagawa, T., Kitagawa, K., Suzuki, S., Liu, N., Kitagawa, M. & Xiong, Y.** 2011. Long non-coding RNA ANRIL is required for the PRC2 recruitment to and silencing of p15(INK4B) tumor suppressor gene. *Oncogene*, 30(16):1956-1962.
- Kung, J.T., Colognori, D. & Lee, J.T.** 2013. Long noncoding RNAs: past, present, and future. *Genetics*, 193(3):651-669.
- Loewer, S., Cabili, M.N., Guttman, M., Loh, Y.H., Thomas, K., Park, I.H., Garber, M., Curran, M., Onder, T., Agarwal, S., Manos, P.D., Datta, S., Lander, E.S., Schlaeger, T.M., Daley, G.Q. & Rinn, J.L.** 2010. Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet*, 42(12):1113-1117.
- Matouk, I., Ayesh, B., Schneider, T., Ayesh, S., Ohana, P., de-Groot, N., Hochberg, A. & Galun, E.** 2004. Oncofetal splice-pattern of the human H19 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, 318(4):916-919.
- Matouk, I., Raveh, E., Ohana, P., Lail, R.A., Gershtain, E., Gilon, M., De Groot, N., Czerniak, A. & Hochberg, A.** 2013. The increasing complexity of the oncofetal h19 gene locus: functional dissection and therapeutic intervention. *Int J Mol Sci*, 14(2):4298-4316.
- Matouk, I.J., DeGroot, N., Mezan, S., Ayesh, S., Abu-lail, R., Hochberg, A. & Galun, E.** 2007. The H19 non-coding RNA is essential for human tumor growth. *PLoS One*, 2(9):e845.
- Matouk, I.J., Mezan, S., Mizrahi, A., Ohana, P., Abu-Lail, R., Fellig, Y., Degroot, N., Galun, E. & Hochberg, A.** 2010. The oncofetal H19 RNA connection: hypoxia, p53 and cancer. *Biochim Biophys Acta*, 1803(4):443-451.
- Núñez, C., Bashein, A.M., Brunet, C.L., Hoyland, J.A., Freemont, A.J., Buckle, A.M., Murphy, C., Cross, M.A., Lucas, G., Bostock, V.J. & Brady, G.** 2000. Expression of the imprinted tumour-suppressor gene H19 is tightly regulated during normal haematopoiesis and is reduced in haematopoietic precursors of patients with the myeloproliferative disease polycythaemia vera. *J Pathol*, 190(1):61-68.
- Pang, K.C., Frith, M.C. & Mattick, J.S.** 2006. Rapid evolution of noncoding RNAs: lack of conservation does not mean lack of function. *Trends Genet*, 22(1):1-5.
- Penny, G.D., Kay, G.F., Sheardown, S.A., Rastan, S. & Brockdorff, N.** 1996. Requirement for Xist in X chromosome inactivation. *Nature*, 379(6561):131-137.
- Peters, J.L., Cnops, G., Neyt, P., Zethof, J., Cornelis, K., Van Lijsebettens, M. & Gerats, T.** 2004. An AFLP-based genome-wide mapping strategy. *Theor Appl Genet*, 108(2):321-327.

- Popov, N. & Gil, J.** 2010. Epigenetic regulation of the INK4b-ARF-INK4a locus: in sickness and in health. *Epigenetics*, 5(8):685-690.
- Prensner, J.R. & Chinnaiyan, A.M.** 2011. The emergence of lncRNAs in cancer biology. *Cancer Discov*, 1(5):391-407.
- Rackham, O., Shearwood, A.M., Mercer, T.R., Davies, S.M., Mattick, J.S. & Filipovska, A.** 2011. Long noncoding RNAs are generated from the mitochondrial genome and regulated by nuclear-encoded proteins. *RNA*, 17(12):2085-2093.
- Randhawa, G.S., Cui, H., Barletta, J.A., Strichman-Almashanu, L.Z., Talpaz, M., Kantarjian, H., Deisseroth, A.B., Champlin, R.C. & Feinberg, A.P.** 1998. Loss of imprinting in disease progression in chronic myelogenous leukemia. *Blood*, 91(9):3144-3147.
- Sado, T., Hoki, Y. & Sasaki, H.** 2005. Tsix silences Xist through modification of chromatin structure. *Dev Cell*, 9(1):159-165.
- Sherborne, A.L., Hosking, F.J., Prasad, R.B., Kumar, R., Koehler, R., Vijayakrishnan, J., Papaemmanuil, E., Bartram, C.R., Stanulla, M., Schrappe, M., Gast, A., Dobbins, S.E., Ma, Y., Sheridan, E., Taylor, M., Kinsey, S.E., Lightfoot, T., Roman, E., Irving, J.A., Allan, J.M., Moorman, A.V., Harrison, C.J., Tomlinson, I.P., Richards, S., Zimmermann, M., Szalai, C., Semsei, A.F., Erdelyi, D.J., Krajcinovic, M., Sinnett, D., Healy, J., Gonzalez Neira, A., Kawamata, N., Ogawa, S., Koeffler, H.P., Hemminki, K., Greaves, M. & Houlston, R.S.** 2010. Variation in CDKN2A at 9p21.3 influences childhood acute lymphoblastic leukemia risk. *Nat Genet*, 42(6):492-494.
- Sirchia, S.M., Tabano, S., Monti, L., Recalcati, M.P., Gariboldi, M., Grati, F.R., Porta, G., Finelli, P., Radice, P. & Miozzo, M.** 2009. Misbehaviour of XIST RNA in breast cancer cells. *PLoS One*, 4(5):e5559.
- Sun, S., Del Rosario, B.C., Szanto, A., Ogawa, Y., Jeon, Y. & Lee, J.T.** 2013. Jpx RNA activates Xist by evicting CTCF. *Cell*, 153(7):1537-1551.
- Taft, R.J., Pheasant, M. & Mattick, J.S.** 2007. The relationship between non-protein-coding DNA and eukaryotic complexity. *Bioessays*, 29(3):288-299.
- Takagi, N. & Sasaki, M.** 1975. Preferential inactivation of the paternally derived X chromosome in the extraembryonic membranes of the mouse. *Nature*, 256(5519):640-642.
- Tano, K., Mizuno, R., Okada, T., Rakwal, R., Shibato, J., Masuo, Y., Ijiri, K. & Akimitsu, N.** 2010. MALAT-1 enhances cell motility of lung adenocarcinoma cells by influencing the expression of motility-related genes. *FEBS Lett*, 584(22):4575-4580.

- Tripathi, V., Ellis, J.D., Shen, Z., Song, D.Y., Pan, Q., Watt, A.T., Freier, S.M., Bennett, C.F., Sharma, A., Bubulya, P.A., Blencowe, B.J., Prasanth, S.G. & Prasanth, K.V.** 2010. The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell*, 39(6):925-938.
- Tsai, M.C., Manor, O., Wan, Y., Mosammaparast, N., Wang, J.K., Lan, F., Shi, Y., Segal, E. & Chang, H.Y.** 2010. Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science*, 329(5992):689-693.
- Wallace, J.A. & Felsenfeld, G.** 2007. We gather together: insulators and genome organization. *Curr Opin Genet Dev*, 17(5):400-407.
- Wang, K.C. & Chang, H.Y.** 2011. Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell*, 43(6):904-914.
- Williams, R.T. & Sherr, C.J.** 2008. The INK4-ARF (CDKN2A/B) locus in hematopoiesis and BCR-ABL-induced leukemias. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 73:461-467.
- Wilusz, J.E., Freier, S.M. & Spector, D.L.** 2008. 3' end processing of a long nuclear-retained noncoding RNA yields a tRNA-like cytoplasmic RNA. *Cell*, 135(5):919-932.
- Wu, H.K., Weksberg, R., Minden, M.D. & Squire, J.A.** 1997. Loss of imprinting of human insulin-like growth factor II gene, IGF2, in acute myeloid leukemia. *Biochem Biophys Res Commun*, 231(2):466-472.
- Xu, C., Yang, M., Tian, J., Wang, X. & Li, Z.** 2011. MALAT-1: a long non-coding RNA and its important 3' end functional motif in colorectal cancer metastasis. *Int J Oncol*, 39(1):169-175.
- Yan, B. & Wang, Z.** 2012. Long noncoding RNA: its physiological and pathological roles. *DNA Cell Biol*, 31 Suppl 1:S34-41.
- Yap, K.L., Li, S., Muñoz-Cabello, A.M., Raguz, S., Zeng, L., Mujtaba, S., Gil, J., Walsh, M.J. & Zhou, M.M.** 2010. Molecular interplay of the noncoding RNA ANRIL and methylated histone H3 lysine 27 by polycomb CBX7 in transcriptional silencing of INK4a. *Mol Cell*, 38(5):662-674.
- Yildirim, E., Kirby, J.E., Brown, D.E., Mercier, F.E., Sadreyev, R.I., Scadden, D.T. & Lee, J.T.** 2013. Xist RNA is a potent suppressor of hematologic cancer in mice. *Cell*, 152(4):727-742.
- Yoshimizu, T., Miroglio, A., Ripoche, M.A., Gabory, A., Vernucci, M., Riccio, A., Colnot, S., Godard, C., Terris, B., Jammes, H. & Dandolo, L.** 2008. The H19 locus acts in vivo as a tumor suppressor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(34):12417-12422.

- Yu, W., Gius, D., Onyango, P., Muldoon-Jacobs, K., Karp, J., Feinberg, A.P. & Cui, H.** 2008. Epigenetic silencing of tumour suppressor gene p15 by its antisense RNA. *Nature*, 451(7175):202-206.
- Zhang, X., Rice, K., Wang, Y., Chen, W., Zhong, Y., Nakayama, Y., Zhou, Y. & Klibanski, A.** 2010. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology*, 151(3):939-947.
- Zhao, J., Dahle, D., Zhou, Y., Zhang, X. & Klibanski, A.** 2005. Hypermethylation of the promoter region is associated with the loss of MEG3 gene expression in human pituitary tumors. *J Clin Endocrinol Metab*, 90(4):2179-2186.
- Zhao, J., Sun, B.K., Erwin, J.A., Song, J.J. & Lee, J.T.** 2008. Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science*, 322(5902):750-756.
- Zhao, J., Zhang, X., Zhou, Y., Ansell, P.J. & Klibanski, A.** 2006. Cyclic AMP stimulates MEG3 gene expression in cells through a cAMP-response element (CRE) in the MEG3 proximal promoter region. *Int J Biochem Cell Biol*, 38(10):1808-1820.
- Zhou, Y., Zhang, X. & Klibanski, A.** 2012. MEG3 noncoding RNA: a tumor suppressor. *J Mol Endocrinol*, 48(3):R45-53.
- Zhou, Y., Zhong, Y., Wang, Y., Zhang, X., Batista, D.L., Gejman, R., Ansell, P.J., Zhao, J., Weng, C. & Klibanski, A.** 2007. Activation of p53 by MEG3 non-coding RNA. *J Biol Chem*, 282(34):24731-24742.