

# NEKÓDUJÍCÍ RNA A MALIGNÍ MELANOM

Anna Palánová, Helena Kupcová Skalníková

Ústav živočišné fyziologie a genetiky AV ČR, Laboratoř aplikovaných proteomových analýz; Palanova@iapg.cas.cz

## Úvod

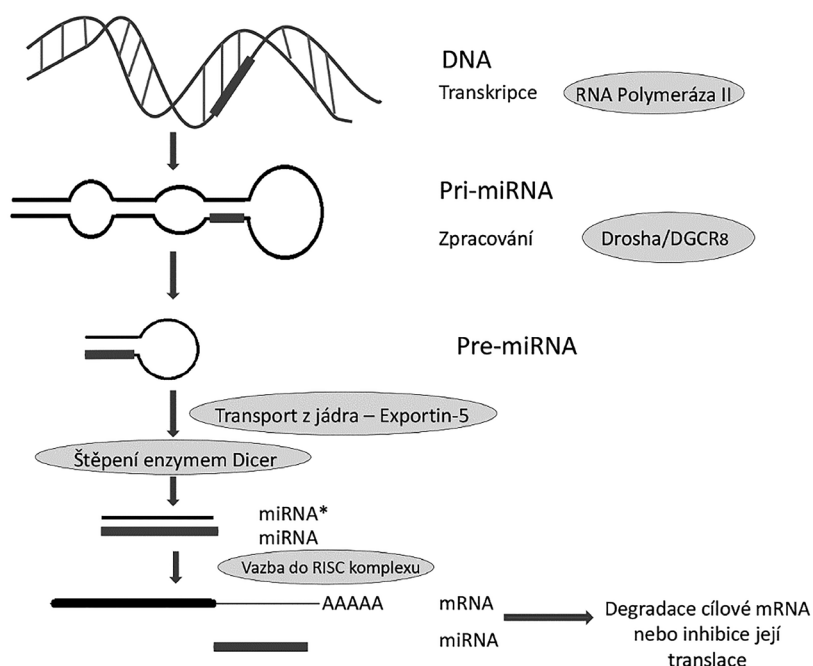
Dědičná informace živočichů, rostlin, bakterií a některých virů je zapsána pomocí DNA (deoxyribonukleová kyselina). Základními stavebními kameny DNA jsou nukleotidy (nt) – „písmena dědičné abecedy“. Těchto „písmen“ jsou u člověka přibližně 3 miliardy<sup>1</sup> a před kompletním přečtením lidského genomu se předpokládalo, že čím složitější je organismus, tím více genů (kódujících proteiny) bude zapsáno v jeho dědičné informaci. Naproti očekávání se ukázalo, že člověk i myš (organismy zastupující vyšší živočichy) mají přibližně stejný počet genů jako *Caenorhabditis elegans* (Háďátka obecná) – mikroskopický oblí červ<sup>2</sup>. Proto se předpokládalo, že zbytek dědičné informace představuje nefunkční tzv. odpadní DNA („junk DNA“), nashromážděnou v průběhu evoluce.

Analýzy genové exprese však ukázaly, že přibližně 90 % genomu je aktivně transkribováno<sup>3</sup> a byly objeveny RNA nekódující proteiny (non-coding RNA, ncRNA), které se dělí dle délky: na dlouhé ncRNA (long ncRNA, lncRNA) o délce 0,2 až 100 kb bez otevřeného čtecího rámce a krátké ncRNA (small ncRNA, sncRNA)<sup>4</sup>. Deregulace některých lncRNA byla popsána u řady nádorových onemocnění a přispívá k jejich patogenezi<sup>5</sup>. Skupina krátkých ncRNA sdružuje krátké interferující RNA (small interfering RNA, siRNA), s promotorem asociované RNA (promoter associated small RNA, pasRNA), s piwi proteiny interagující RNA (Piwi-interacting RNA, piRNA; hlavní funkcí komplexů piRNA s piwi proteiny je umlčování transpozonů v pohlavních

buňkách živočichů<sup>6</sup>) a především mikroRNA (miRNA)<sup>7</sup>. První popsanou miRNA byla lin-4<sup>8</sup> a tento objev V. Ambrose a jeho kolegů vedl k vzniku celého nového odvětví genetiky.

## Biogeneze a funkce miRNA

miRNA byly objeveny v roce 1993<sup>8</sup>, jejich biogeneze byla podrobněji popsána v roce 2002<sup>9</sup> a ve své maturované podobě představují úseky RNA o délce většinou 22 nukleotidů (20 – 200 nt). Nicméně jsou přepisované z DNA jako více než 1000 nt dlouhá prekurzorová molekula, nazývaná primární transkript (pri-miRNA, Obr. 1). Vzniklá pri-miRNA má vlásenkovou strukturu



Obr. 1 Biogeneze a funkce miRNA

a je zpracována enzymem Drosha, který v komplexu s dalšími proteiny rozpoznává a štěpí pri-miRNA mezi vlásenkovou a jednovláknovou strukturou. Molekula vzniklá z pri-miRNA po zpracování enzymem Drosha je dlouhá přibližně 60 – 100 nt a nazývá se prekurzorová miRNA (pre-miRNA). Poté je pre-miRNA transportována z buněčného jádra do cytoplazmy, kde je zpracována enzymem Dicer. Ten štěpí molekulu RNA na dvě části, z nichž jedna je většinou degradována, zatímco druhá se stává součástí RISC komplexu (RNA-induced silencing complex). RISC komplex se váže na komplementární sekvenci v 3' nepřekládané (3'UTR – untranslated region) oblasti cílové mRNA a v závislosti na „přesnosti vazby“ v tzv. seed oblasti dochází buď k degradaci cílové mRNA, nebo zamezení syntézy proteinu bez degradace mRNA. Popsaná dráha biogeneze miRNA se nazývá kanonická, jelikož byly popsány i jiné dráhy, například dráha nezávislá na enzymu Drosha.

Regulace pomocí miRNA je jedním z epigenetických faktorů, které řídí řadu buněčných procesů, jako jsou proliferace a diferenciací, senescence, přežití, autofágie a migrace buněk a může ovlivňovat i buněčný metabolismus a genomovou stabilitu. Počet popsanych miRNA stále narůstá, nejvíce anotovaných miRNA je u člověka a myši. Detailnější informace o biogenezi, názvosloví a typech miRNA jsou k dispozici v novějších odborných článcích<sup>10</sup> či na některých webových zdrojích<sup>11</sup>.

## Maligní melanom

Maligní melanom (MM) je kožní nádor rezistentní k terapii díky mnoha mechanismům podporujícím jeho progresi. MM vzniká přeměnou kožních buněk melanocytů, které produkují barvivo melanin chránící DNA kožních buněk před účinky UV záření<sup>12</sup>. Počáteční stadia onemocnění MM, pokud jsou včas odhalena, jsou dobře léčitelná pomocí chirurgického odstranění nádoru s dostatečně širokým lemlem okolní zdravé tkáně. Pokud ovšem dojde k průniku nádoru přes bazální membránu či rozšíření nádorových buněk do organismu (vzdálené metastázy), je prognóza pacienta ve většině případů velmi nepříznivá. Incidence MM celosvětově narůstá, v České republice došlo za poslední 4 dekády ke čtyřnásobnému zvýšení výskytu MM<sup>13</sup>.

Vědci Douglas Hanahan a Robert A. Weinber v roce 2000 definovali nádor na základě šesti obecných znaků<sup>14</sup>:

1. soběstačnost nádorových buněk v produkci růstových faktorů;
2. necitlivost nádorových buněk k faktorům zastavujícím buněčný cyklus;
3. narušení apoptózy nádorových buněk;
4. neomezená replikace nádorových buněk;
5. schopnost nádorů vyvolat angiogenezi;
6. schopnost nádorových buněk pronikat do tkání a vytvářet metastázy.

V roce 2011 stejní autoři revidovali a doplnili svou práci o další znaky definující nádory: energetický metabolismus je deregulován; nádorové buňky unikají imunitnímu systému; nádor vyvolává zánětlivou reakci; v nádorové DNA vznikají mutace a genomová nestabilita<sup>15</sup>.

## Role miRNA v patogenezi maligního melanomu

Problematika miRNA u nádorových onemocnění je velmi aktuální téma. Bylo prokázáno, že miRNA představují klíčové komponenty různých buněčných procesů ve vývoji nádorů, například regulují jevy tak odlišné jako exprese proteinů či jaderné funkce uvnitř buňky a zároveň mohou sloužit jako mezibuněčné signály – jsou sekretovány a transportovány pomocí exosomů či jiných extracelulárních váčků<sup>16</sup>.

Mnoho studií odhalilo rozdíly v expresi různých miRNA mezi zdravou tkání a nádorem, či mezi primárním nádorem a metastatickými ložisky. U MM byly zjištěny rozdíly v expresi miRNA mezi melanomovými buňkami a normálními melanocyty. Tyto změny mohou být způsobeny chromozomálními abnormalitami, epigenetickou regulací či dalšími faktory ovlivňujícími biogenezi miRNA<sup>17</sup>.

V souvislosti s MM jsou často studovány tyto miRNA: miR-21<sup>17,18</sup>, miR-7-5p<sup>20,21</sup>, miR-204<sup>22,23</sup>, miR-221<sup>24,25</sup> a miR-222<sup>24,26</sup>. miR-21 je považována za klíčový onkogen, který je exprimován v mnoha typech nádorů<sup>27,28</sup>. Cílem této miRNA jsou mRNA tumor-supresorových proteinů, regulátorů buněčného cyklu a vnitřní a vnější dráhy aktivace apoptózy<sup>29</sup>. miR-21 je také jednou z nejvíce melanomem sekretovaných miRNA prostřednictvím exosomů<sup>30</sup>. Bylo prokázáno, že exprese miR-21 může být zvyšována změnami prostředí, epigenetickými a genetickými změnami, které všechny mohou podporovat vznik melanomu<sup>31</sup>. Vztah nádorových znaků a genů ovlivňovaných miR-21 znázorňuje Obr. 2.

miR-7-5p hraje důležitou roli ve zdravé i nemocné tkáni a byla potvrzena jako nádorový supresor<sup>32</sup>. U melanomu tato miRNA potlačuje růst a životaschopnost nádorových buněk a inhibuje tvorbu metastáz v plících<sup>20</sup>.

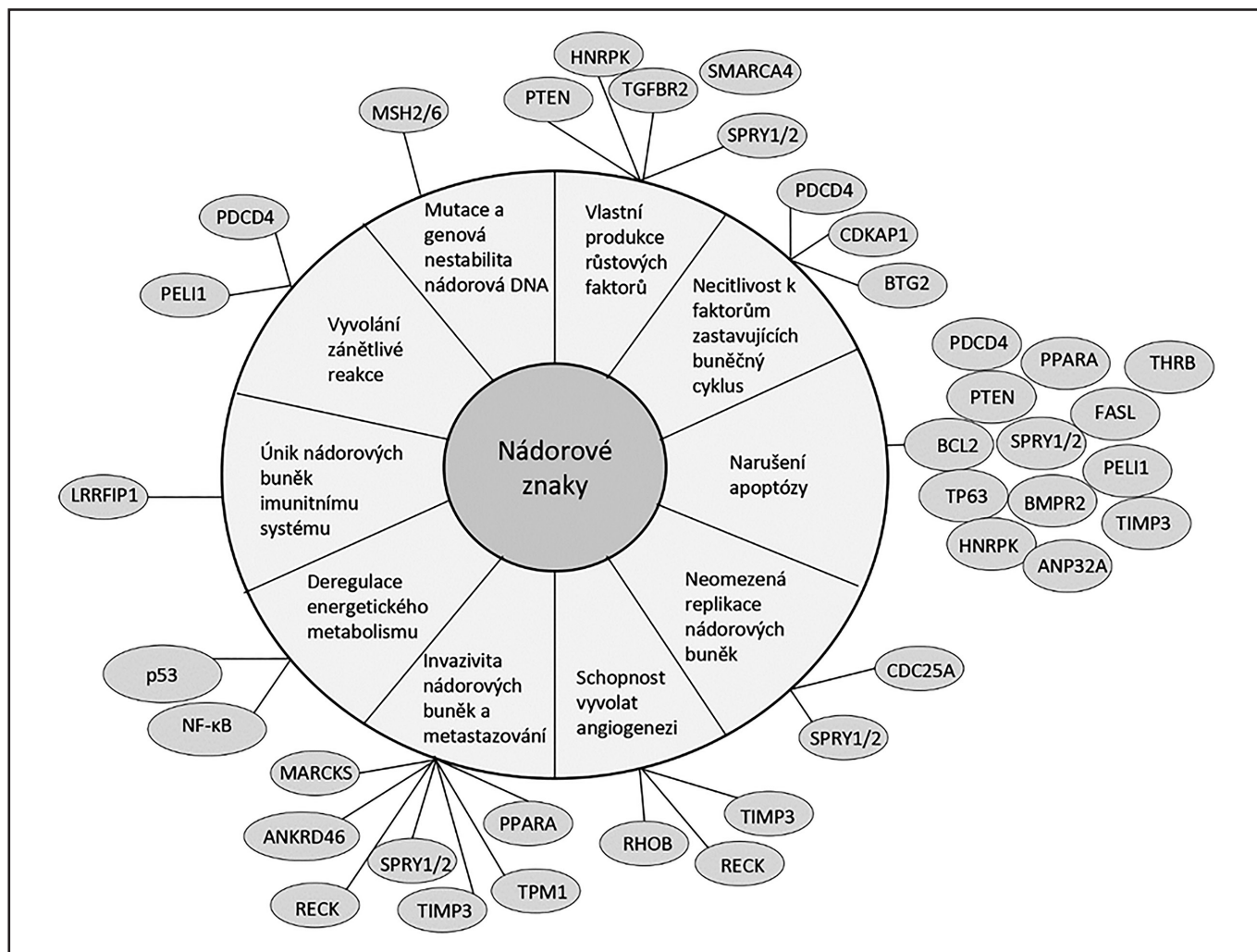
miR-204 vykazuje tumor supresorové funkce. Exprese miR-204 je snížena u MM v porovnání s benigními névy<sup>23</sup>. Ztráta její exprese má negativní efekt na přežití pacientů s MM, kteří byli zároveň nositeli specifických mutací<sup>22</sup>.

Zvýšená exprese protumorigenních miR-221 a miR-222 způsobuje aktivaci několika základních drah ovlivňujících přežívání buněk a inhibici tvorby melaninu<sup>24</sup>. Zvýšená exprese miR-222 podporuje invazivitu buněk nádoru a zkracuje dobu přežití pacientů<sup>26</sup>.

Ke vzniku nádorových onemocnění mohou přispívat i polymorfismy v genech pro miRNA. U pacientů s familiárním maligním melanomem bylo mimo jiné popsáno 8 nových sekvenčních variant miR-34a<sup>32</sup>.

## Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) a maligní melanom

Biogeneze lncRNA je ve většině případů podobná biogenezi mRNA; jsou transkribovány RNA polymerázou II, podstupují sestřih, přidání „čepičky“ na 5' konci a polyadenylaci (existují samozřejmě i výjimky)<sup>33,34</sup>. Funkce těchto RNA jsou velice rozmanité, ovlivňují téměř všechny procesy v buňce a mohou hrát roli i ve vývoji maligních onemocnění.



**Obr. 2: Vztah nádorových znaků a genů ovlivňovaných miR-21**

Znaky definující nádory dle Hanahana a Weinberga ve vztahu ke genům, které jsou cílem miR-21. Některé geny se podílejí na více nádorových znacích a každý znak je ovlivňován minimálně jedním cílem miR-21. Upraveno dle Becker Buscaglia a kol., 2011<sup>29</sup>. miR-21 je mimo jiné zapojena i do regulace energetického metabolismu nádorových buněk jako aktivátor NF-κB signalizace a naopak negativní regulátor p53. Zatímco NF-κB podporuje dělení buněk a rychlé získání energie glykolýzou, p53 zpomaluje příjem glukózy a podporuje tvorbu energie pomalejší oxidativní fosforylací<sup>42</sup> miR-21 tak může v nádorech přispívat k rychlému získání energie glykolýzou za tvorby laktátu bez zapojení oxidativní fosforylace (Warburgův efekt).

Například lncRNA SPRIGHTLY (transkribovaná z intronu genu SPRY4) je zapojena do regulace buněčné proliferace, apoptózy, organizace chromatinu, regulace odpovědi na poškození DNA a buněčného cyklu u melanocytů. Melanomové buňky mají ve srovnání se zdravými melanocyty výrazně vyšší expresi této lncRNA<sup>35</sup>.

Zvýšená exprese lncRNA SLNCR1 podporuje invazivitu melanomových buněk a snižuje dobu přežití pacientů s MM<sup>37</sup>.

S růstem a tvorbou metastáz mnoha nádorových onemocnění je spojená také lncRNA MALAT1; u MM bylo zjištěno, že tato lncRNA podporuje proliferaci, invazivitu a migraci melanomových buněk díky „vychytávání“ miR-22 (tato miRNA byla potvrzena jako nádorový supresor u MM)<sup>38</sup>.

Další u MM vysoce exprimovanou lncRNA je HEIH, která podporuje proliferaci, invazivitu a migraci melanomových buněk<sup>39</sup>.

I přes to, že znalosti o lncRNA nejsou příliš rozsáhlé, již dnes můžeme říci, že představují biomolekuly s potenciálním významem v onkologii. Jako příklad diagnostického a prognostického faktoru lze uvést

lncRNA PCA3, specificky exprimovanou buňkami karcinomu prostaty, sloužící jako biomarker tohoto onemocnění detekovatelný neinvazivně v moči pacientů<sup>40</sup>. lncRNA díky svým schopnostem regulovat genovou expresi a buněčné signální dráhy mohou být cílem protinádorových terapií. Léčebné ovlivnění exprese lncRNA je zatím pouze ve stadiu výzkumu<sup>41</sup>.

## Závěr

Výzkum nekódujících RNA, které byly dříve považované za genetický „odpad“, dnes představuje velmi rychle se rozvíjející oblast. Anotovaných miRNA stále přibývá a díky vysoké mezidruhové konzervovanosti těchto struktur je možné snáze porovnávat výsledky výzkumu na modelových organismech (např. myši či praseti) s výsledky studií u lidských pacientů.

Stále častější využití tkáňových či buněčných kultur usnadňuje poznání základních procesů odehrávajících se v jednotlivých buňkách, interakcí mezi buňkami a umožňuje cílené ovlivňování buněčných procesů, což přináší hlubší pohled do buněčné biologie a biologie nádorů.

I přes velký pokrok, který nastal v této oblasti, jsme teprve na počátku dlouhé cesty od identifikace jednotlivých komponentů buněčných drah k úspěšné aplikaci výsledků výzkumu v léčbě zhoubných onemocnění. Cílem současných snah je vytvoření léčby „na míru“ danému pacientovi, která umožní nejen potlačení stávajícího nádorového onemocnění, ale také zabrání případnému návratu onemocnění v budoucnosti.

#### Literatura:

1. Natl. Hum. Genome Res. Inst. NHGRI. Available at: <https://www.genome.gov/12011238/an-overview-of-the-human-genome-project/>. Accessed January 9, 2019.
2. Taft RJ, Pheasant M, Mattick JS: *BioEssays* 29, 288 (2007).
3. Taft RJ, Pang KC, Mercer TR, et al.: *J. Pathol.* 220, 126 (2010).
4. Esteller M: *Nat. Rev. Genet.* 12, 861 (2011).
5. Gibb EA, Brown CJ, Lam WL: *Mol. Cancer* 10, 38 (2011).
6. Siomi MC, Sato K, Pezic D, et al.: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 12, 246 (2011).
7. Stefani G, Slack FJ: *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 9, 219 (2008).
8. Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V: *Cell* 75, 843 (1993).
9. Lee Y et al.: *EMBO J.* 21, 4663 (2002).
10. Saliminejad K, Khorshid HRK, Fard SS, et al.: *J. Cell. Physiol.* 234, 5451 (2019).
11. Available at: [https://www.abmgood.com/marketing/knowledge\\_base/miRNA\\_Introduction.php](https://www.abmgood.com/marketing/knowledge_base/miRNA_Introduction.php). Accessed January 14, 2019.
12. Hartman ML, Czyz M: *J. Invest. Dermatol.* 135, 352 (2015).
13. Dvořánková B, Szabo P, Kodet O, et al.: *Protoplasma* 254, 1143 (2017).
14. Hanahan D, Weinberg RA: *Cell* 100, 57 (2000).
15. Hanahan D, Weinberg RA: *Cell* 144, 646 (2011).
16. Mione M, Bosserhoff A: *Pigment Cell Melanoma Res.* 28, 340 (2015).
17. Gajos-Michniewicz A, Czyz M: *Cancers* 11, 326 (2019).
18. Melnik BC: *J. Transl. Med.* 13 (2015). Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/13/1/202>. Accessed October 10, 2018.
19. Jiao J, Fan Y, Zhang Y: *J. Int. Med. Res.* 43, 672 (2015).
20. Giles KM, Brown RAM, Ganda C, et al.: *Oncotarget* 7, 31663 (2016).
21. Sun X, Li J, Sun Y, et al.: *Oncotarget* 7 (2016). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/10669>. Accessed January 16, 2019.
22. Galasso M, Morrison C, Minotti L, et al.: *Mol. Cancer* 17, 71 (2018).
23. Palkina N, Komina A, Aksenenko M, et al.: *Oncol. Lett.* (2018). Available at: <http://www.spandidos-publications.com/10.3892/ol.2018.8443>. Accessed November 14, 2018.
24. Felli N, Errico M, Pedini F, et al.: *Oncogene* 35 (2015).
25. Kanemaru H, Fukushima S, Yamashita J, et al.: *J. Dermatol. Sci.* 61, 187 (2011).
26. Felicetti F, De Feo A, Coscia C, et al.: *J. Transl. Med.* 14 (2016). Available at: <http://www.translational-medicine.com/content/14/1/56>. Accessed December 3, 2018.
27. Medina PP, Nolde M, Slack FJ: *Nature* 467, 86 (2010).
28. Krichevsky AM, Gabriely G: *J. Cell. Mol. Med.* 13, 39 (2009).
29. Buscaglia LEB, Li Y: *Chin. J. Cancer* 30, 371 (2011).
30. Saldanha G, Potter L, Shendge P, et al.: *J. Invest. Dermatol.* 133, 1381 (2013).
31. Box NF, Terzian T: *Pigment Cell Melanoma Res.* 21, 525 (2008).
32. Horsham JL, Ganda C, Kalinowski FC, et al.: *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 69, 215 (2015).
33. Cozzolino AM, Pedace L, Castori M, et al.: *Fam. Cancer* 11, 201 (2012).
34. Spurlock CF, Crooke PS, Aune TM: *J. Immunol. Bal-tim. Md* 1950 197, 4509 (2016).
35. Moran VA, Perera RJ, Khalil AM: *Nucleic Acids Res.* 40, 6391 (2012).
36. Zhao W, Mazar J, Lee B, et al.: *J. Invest. Dermatol.* 136, 819 (2016).
37. Schmidt K, Joyce CE, Buquicchio F, et al.: *Cell Rep.* 15, 2025 (2016).
38. Luan W, Li L, Shi Y, et al.: *Oncotarget* 7 (2016). Available at: <http://www.oncotarget.com/fulltext/11564>. Accessed October 31, 2018.
39. Zhao H, Xing G, Wang Y, et al.: *Biosci. Rep.* 37, BSR20170682 (2017).
40. Prensner JR, Chinnaiyan AM: *Cancer Discov.* 1, 391 (2011).
41. Schmitt AM, Chang HY: *Cancer Cell* 29, 452 (2016).
42. Ak P, Levine AJ: *FASEB J.* 24, 3643 (2010).

#### Souhrn

##### Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Nekódující RNA a maligní melanom

Incidence maligního melanomu, závažného kožního nádoru, celosvětově narůstá. Léčba tohoto onemocnění při pozdním odhalení je v dnešní době téměř nemožná. Nekódující RNA, dříve považované za „odpad“ evoluce, byly odhaleny jako klíčoví hráči ve většině buněčných procesů a mohou ovlivňovat i růst a prognózu nádorů. Očekává se, že poznatky v rychle se rozvíjejícím výzkumu nekódujících RNA přispějí k diagnostice a léčbě nádorových onemocnění.

**Klíčová slova:** nádor, maligní melanom, nekódující RNA, miRNA

#### Summary

##### Palánová A., Kupcová Skalníková H.: Noncoding RNA and malignant melanoma

Incidence of malignant melanoma, a very dangerous skin cancer, is rising worldwide. Later stages of melanoma are refractory to therapy. Noncoding RNAs, previously considered as „junk“ RNA, were currently confirmed as key players in almost all cellular processes and may also influence tumour growth and prognosis. Research of noncoding RNAs is expected to contribute to diagnosis and treatment of malignant diseases.

**Keywords:** tumour, malignant melanoma, noncoding RNA, miRNA

#### Poděkování

Tato studie vznikla za podpory Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy v rámci Národního programu udržitelnosti I. (projekt LO1609) a Operačního programu Výzkum, vývoj a vzdělávání (projekt CZ.02. 1. 01/0.0/0.0/16\_019/0000785).