

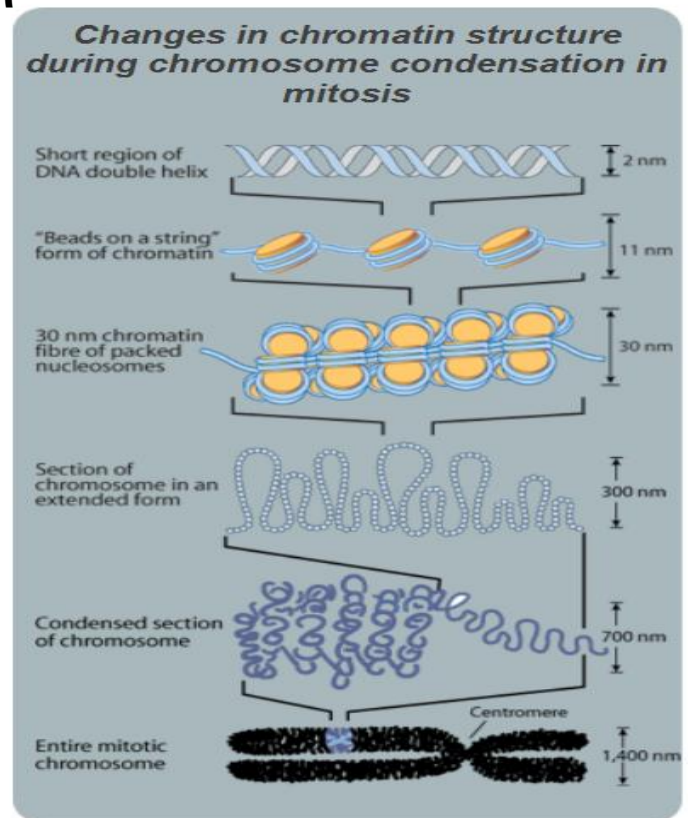
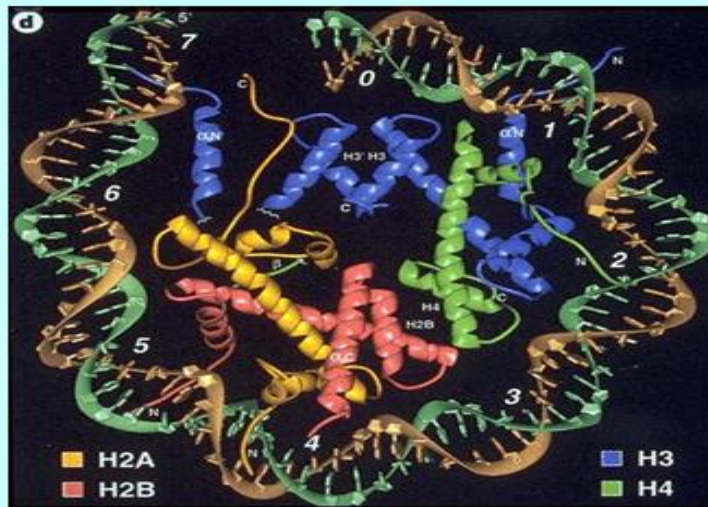
Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και η ρύθμιση του γονιδιώματος

**Κοτσίνας Αθανάσιος
Επίκουρος Καθηγητής
Ομάδα Μοριακής Καρκινογένεσης
Εργ. Ιστολογίας-Εμβρυολογίας
Ιατρική Σχολή, ΕΚΠΑ**

Μεταβολές που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων

- Μεταβολές στην πρωτοταγή νουκλεοτιδική αλληλουχία του DNA (Μεταλλάξεις)
- Επιγενετικές μεταβολές

Chromatin Structure



Σύγχρονος ορισμός της επιγενετικής

Η μελέτη αλλαγών που επηρεάζουν την έκφραση γονιδίων, οι οποίες κληρονομούνται αλλά δεν επηρεάζουν την πρωτοταγή δομή του DNA

Επιγενετική: Ιστορικοί σταθμοί

1942 Conrad H. Waddington:

- «η αιτιατή αλληλεπίδραση γονιδίων με τα προϊόντα τους, το οποίο οδηγεί στην εμφάνιση του φαινοτύπου»

1975 Holliday & Pugh:

- προτείνουν ομοιοπολικές χημικές τροποποιήσεις του DNA (μεθυλίωση σε θέσεις CpG)

1985-1995:

- αποσαφηνίζονται οι επιγενετικοί μηχανισμοί αδρανοποίησης του χρωμοσώματος X στα θήλεα θηλαστικά

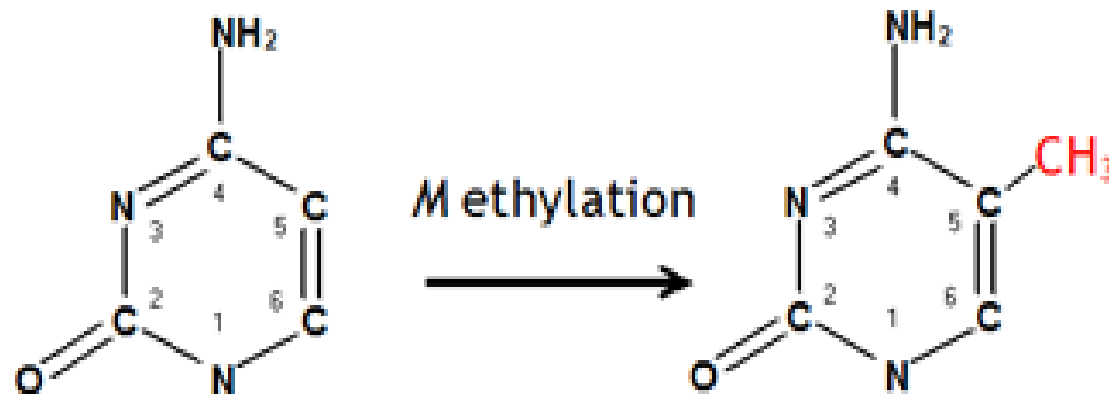
1990 έως σήμερα:

- καθιερώνεται η επιγενετική ως ξεχωριστός ερευνητικός κλάδος

Επιγενετικές τροποποιήσεις της χρωματίνης

- Μεθυλίωση του DNA
- Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών
- Προσθαφαίρεση νουκλεοσωμάτων ή/και αντικατάσταση κανονικών ιστονών με ισομορφές
- Έλεγχος από μη κωδικοποιό RNA

Μεθυλίωση κυτοσίνης στους ανώτερους ευκαρυώτες



Δότης μεθυλ-ομάδας: S-adenosyl-L-methionine

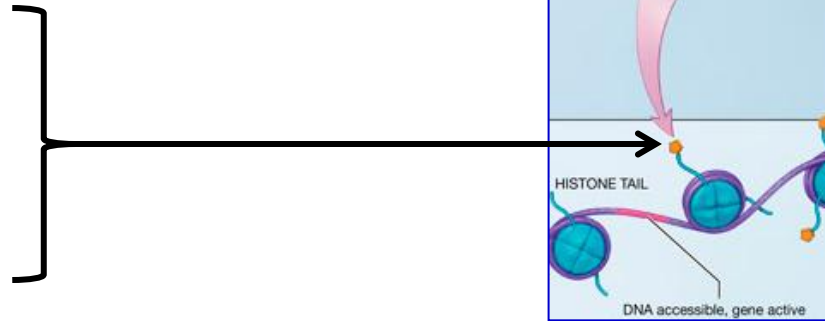
Δέκτης μεθυλ-ομάδας: Κυτοσίνη σε δινουκλεοτίδιο CpG (5meCpG)

Καταλύτης: DNMTs: DNMT1, DNMT2 (?), DNMT3a/b, DNMT3L

Μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις ιστονών

- N-τελικές τροποποιήσεις (κώδικας ιστονών)

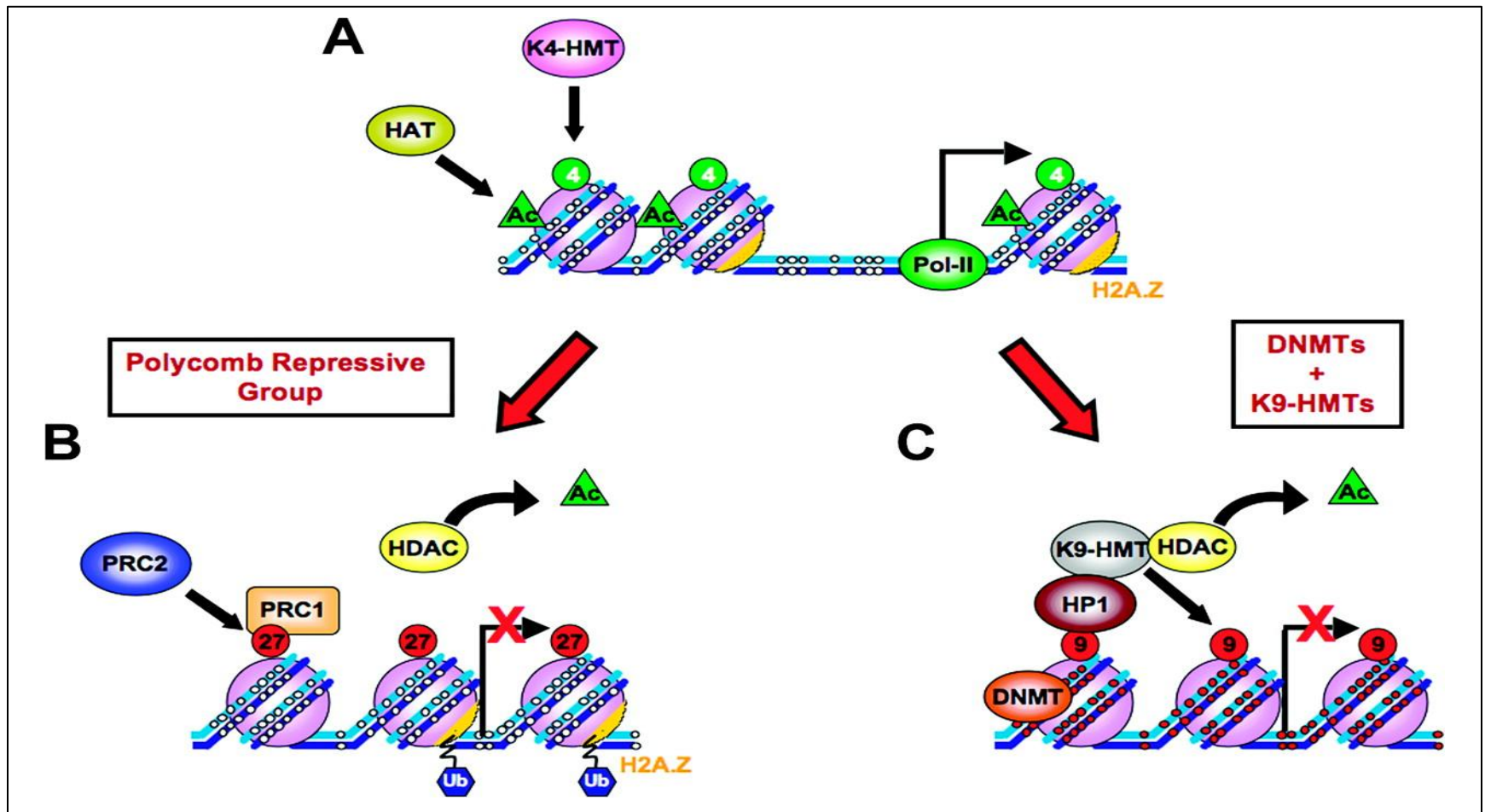
- Ακετυλίωση (Ac)
- Μεθυλίωση (Met)
- Φωσφορυλίωση (P)
- Σουμοϋλίωση (Sumo)
- Ουβικητινοποίηση (Ub)



- Οδηγούν σε **ενεργοποίηση ή αδρανοποίηση** γονιδίων (χαλαρή ή «πακεταρισμένη» χρωματίνη)
- Παρουσιάζουν **μεγάλο φάσμα** συνδυασμών
- **Συνεργιστική δράση** με τη μεθυλίωση του DNA

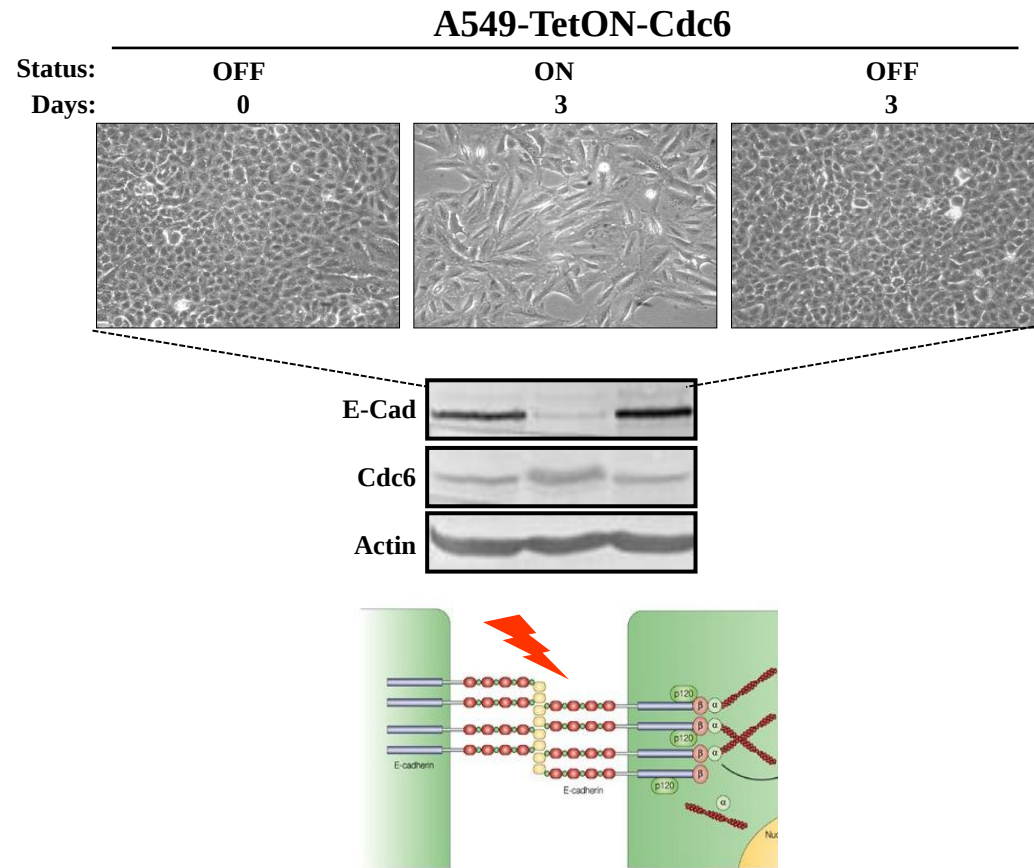
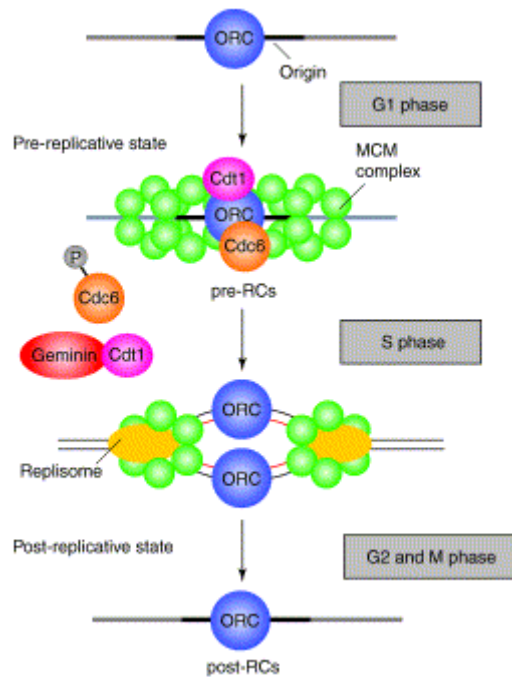
Συνεργιστική δράση μεθυλίωσης και τροποποίησης ιστονών

Ενεργοποίηση (A) – Καταστολή (B, C)



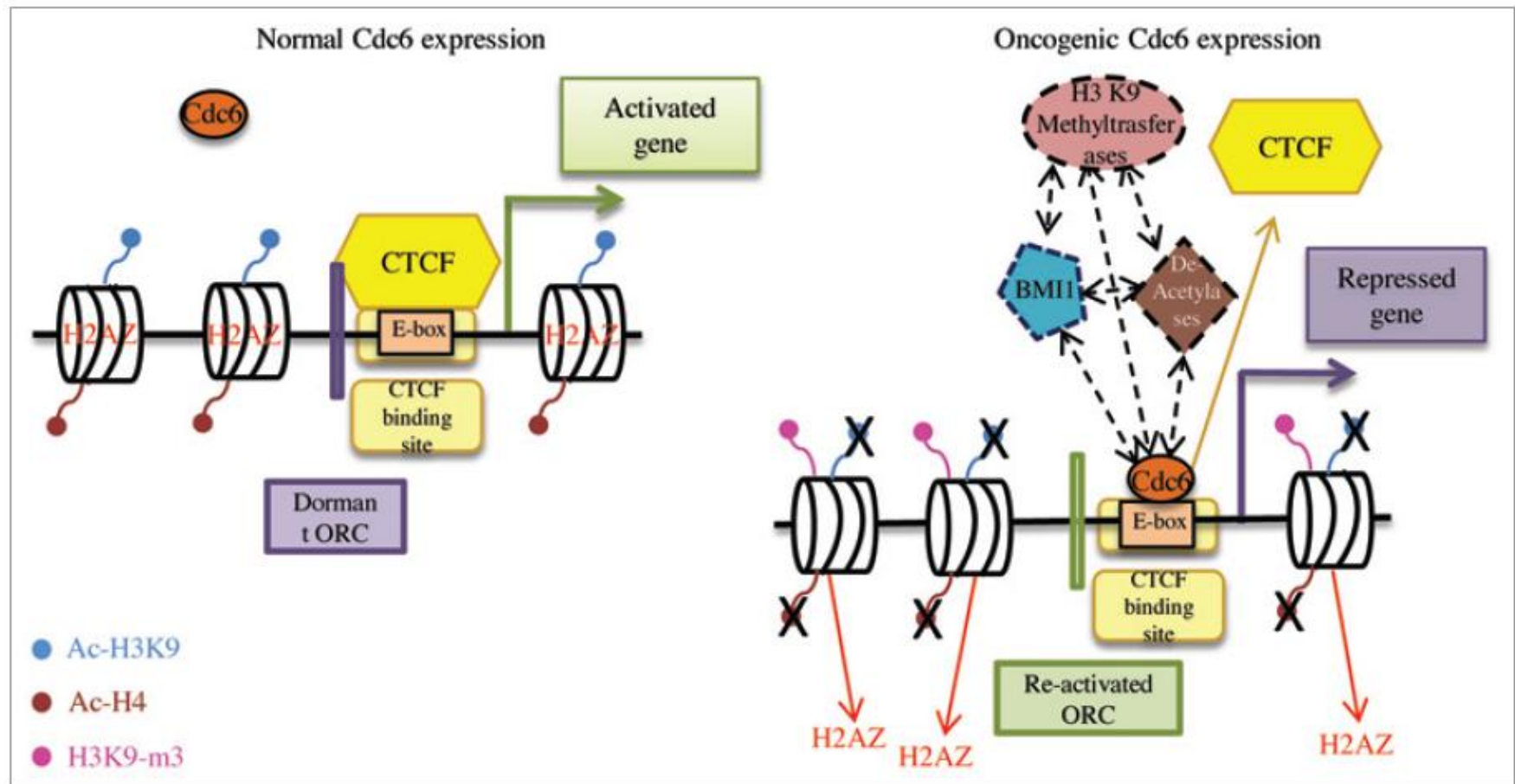
Ποσοτικές διαταραχές φυσιολογικών πρωτεϊνών οδηγούν σε νέες δράσεις π.χ. Cdc6: Όταν υπερεκφράζεται δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας (1)

DNA licensing



Sideridou et al., JCB 2011

Cdc6: Όταν υπερεκφράζεται δρα σαν μεταγραφικός καταστολέας (2)



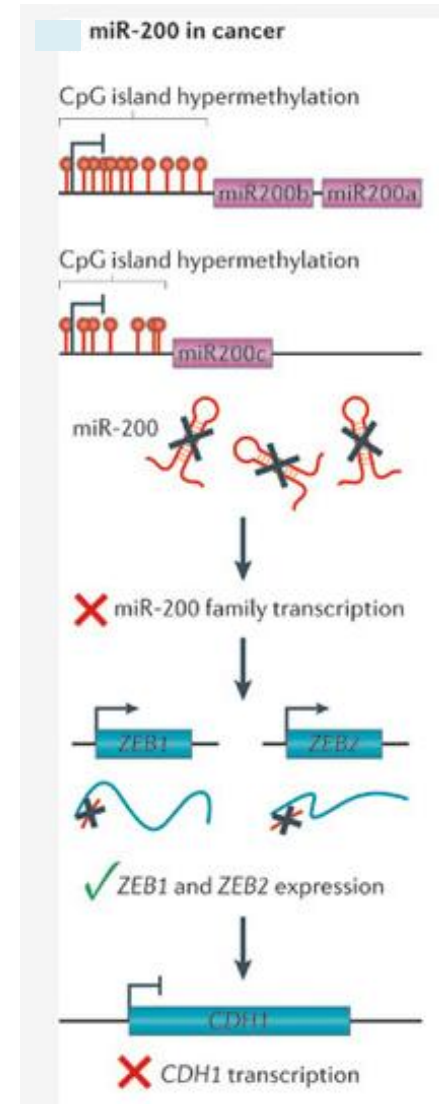
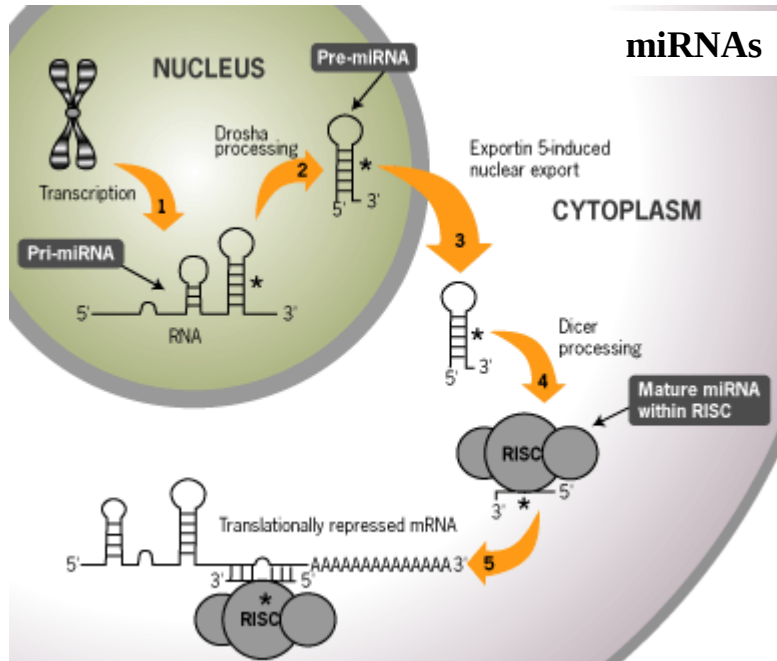
Μη κωδικοποιό (non-coding) RNA

Μη κωδικοποιούμενο ncRNA: Είδη

- Μικρού μεγέθους (small) ncRNA: < 200 nt
 - micro RNAs (miRNA)
 - small nucleolar (snoRNAs)
 - piwi-interacting RNAs (piRNAs)
 - small interfering RNAs (siRNAs)
 - κ.α.
- Μακρή (long) ncRNA: > 200 nt

Μικρό μη κωδικοποιούμενο ncRNA : Χαρακτηριστικά

- RNA μικρού μήκους
 - Επικρατέστερα τα miRNAs (22 nt)
- Δεν κωδικοποιούν πρωτεΐνες
- Επιδρούν μετα-μεταγραφικά σε mRNAs
- Αποσιωπούν την έκφραση των mRNAs
 - Παρεμποδίζοντας την διαδικασία της μετάφρασης ή
 - Προκαλούν αποικοδόμηση των mRNAs

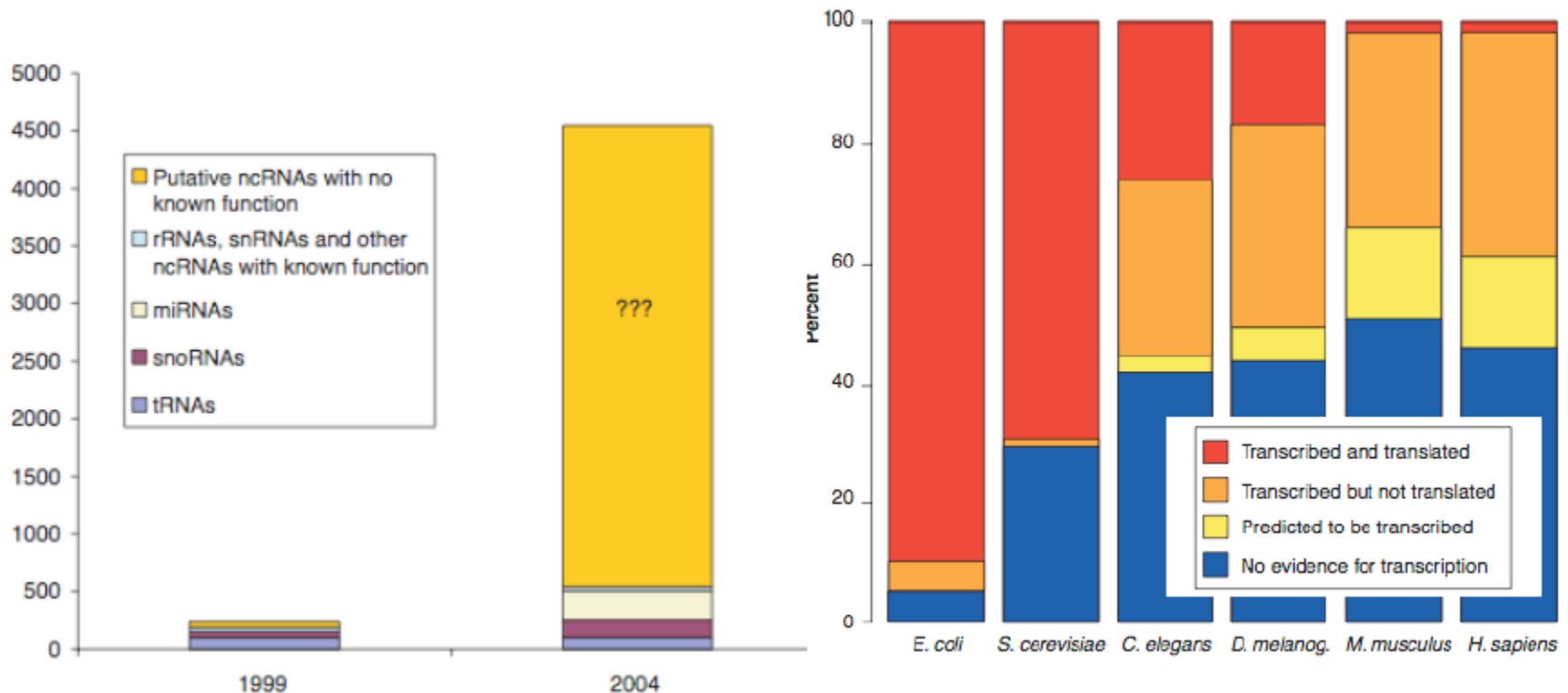


Μακρή μη κωδικοποιούμενο ncRNA: Χαρακτηριστικά

- Μακρή (long) ncRNA: > 200 nt
 - μεταγράφονται από την RNA pol II
 - συχνά φέρουν poly A ουρά
 - παρουσιάζουν σύνθετα πρότυπα ματίσματος (splicing)
 - αλλά δεν έχουν αναγνωστικό πλαίσιο (ORF)
 - μεταγράφονται τόσο σε sense όσο και σε antisense προσανατολισμό σε σχέση με τη κωδικοποιούσα περιοχή ενός γονιδίου

Ανακάλυψη και ταυτοποίηση lncRNAs

- 1980-1990: Ανακαλύπτονται τα πρώτα lncRNAs με κλασικές μεθόδους κλωνοποίησης, πχ *Xist* και *H19*
- Αρχές 2000: Μαζική χρήση μεγάλης κλίμακας αλληλούχιση cDNAs οδηγεί για πρώτη φορά στην ανακάλυψη μεγάλων αριθμών lncRNAs
- Μέσα 2000: Ο αριθμός των αναμενόμενων γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μειώνετε, ενώ ανεβαίνει εκθετικά ο αριθμός των lncRNAs που ανακαλύπτονται



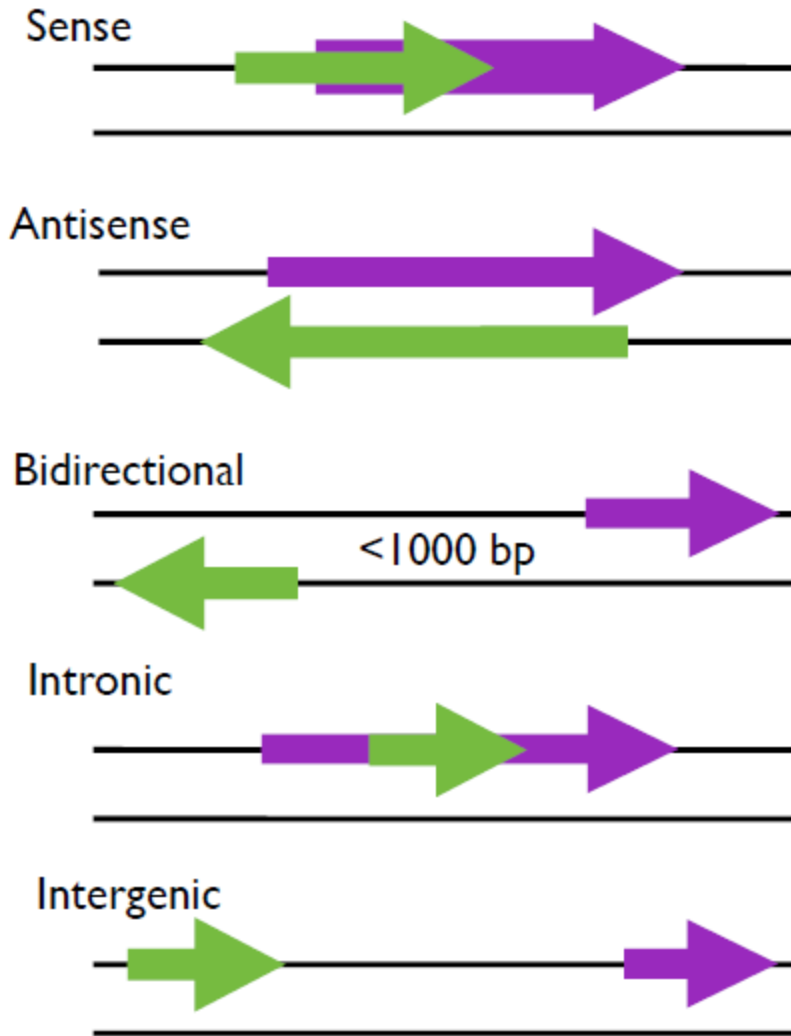
Τύποι ncRNAs

Category	Name	Quality of supporting data	Specific role in carcinogenesis	Aberration in cancer
Housekeeping RNAs	Transfer RNAs	High	No	No
	Ribosomal RNAs	High	No	No
	Small nucleolar RNAs	High	No	No
	Small nuclear RNAs	High	No	No
Small ncRNAs (200 bp or less in size)	MicroRNAs	High	Yes	Amplification, deletion, methylation, gene expression
	Tiny transcription initiation RNAs	High	Not known	Not known
	Repeat associated small interfering RNAs	High	Not known	Not known
	Promoter-associated short RNAs	High	Not known	Not known
	Termini-associated short RNAs	High	Not known	Not known
	Antisense termini associated short RNAs	High	Not known	Not known
	Transcription start site antisense RNAs	Moderate	Not known	Not known
	Retrotransposon-derived RNAs	High	Not known	Not known
	3'UTR-derived RNAs	Moderate	Not known	Not known
	Splice-site RNAs	Poor	Not known	Not known
Long ncRNA (over 200 bp in size)	Long or large intergenic ncRNAs	High	Yes	Gene expression, translocation
	Transcribed ultraconserved regions	High	Yes	Gene expression
	Pseudogenes	High	Yes	Gene expression, deletion
	Enhancer RNAs	High	Yes	Not known
	Repeat-associated ncRNAs	High	Not known	Not known
	Long intronic ncRNAs	Moderate	Not known	Not known
	Antisense RNAs	High	Yes	Gene expression
	Promoter-associated long RNAs	Moderate	Not known	Not known
	Long stress-induced non-coding transcripts	Moderate	Yes	Gene expression

Παραδείγματα lncRNAs

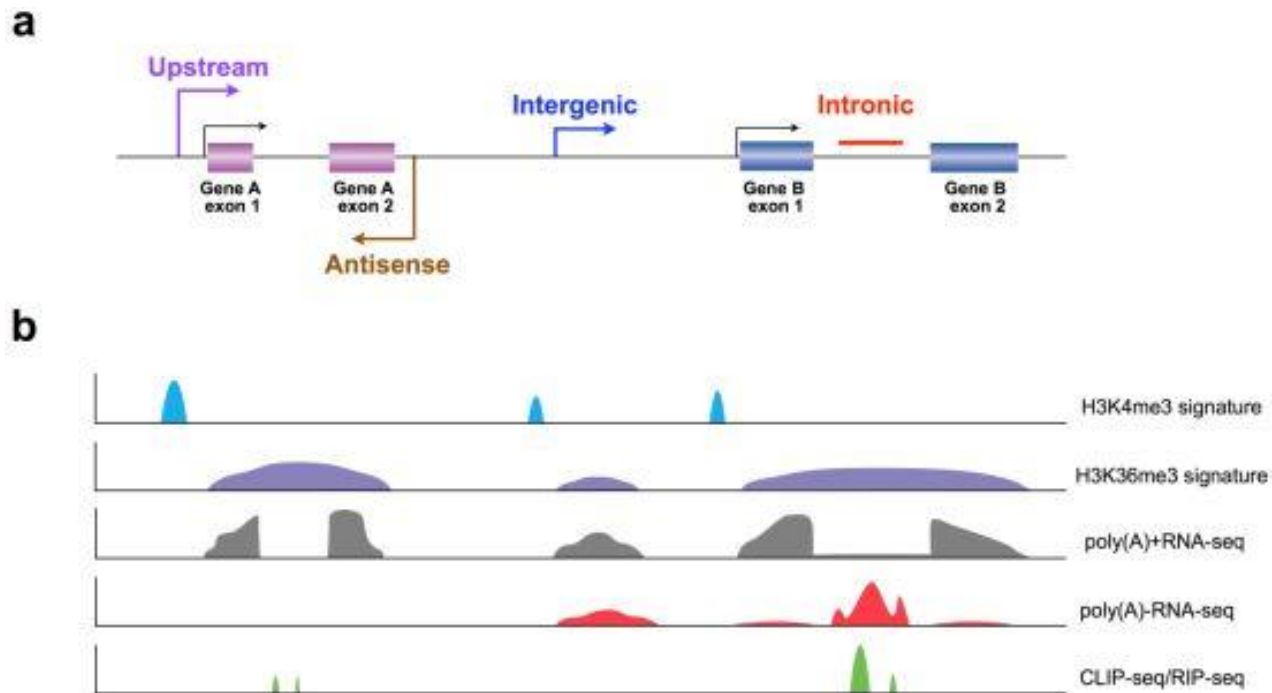
lncRNA	Function	Cancer Type	Cancer Phenotype	Molecular Interactors
HULC	Biomarker	Hepatocellular	Not known	Unknown
PCA3	Biomarker	Prostate	Not known	Unknown
ANRIL/p15AS	Oncogenic	Prostate, Leukemia	Suppression of senescence via INK4A	Binds PRC1 and PRC2
HOTAIR	Oncogenic	Breast, hepatocellular	Promotes metastasis	Binds PRC2 and LSD1
MALAT1/NEAT2	Oncogenic	Lung, prostate, breast, colon	Unclear	Contributory to nuclear paraspeckle function
PCAT-1	Oncogenic	Prostate	Promotes cell proliferation; inhibits BRCA2	Unknown
PCGEM1	Oncogenic	Prostate	Inhibits apoptosis; promotes cell proliferation	Unknown
TUC338	Oncogenic	Hepatocellular	Promotes cell proliferation and colony formation	Unknown
uc.73a	Oncogenic	Leukemia	Inhibits apoptosis; promotes cell proliferation	Unknown
H19	Oncogenic; Tumor suppressive	Breast, hepatocellular	Promotes cell growth and proliferation; activated by cMYC; downregulated by prolonged cell proliferation	Unknown
GAS5	Tumor suppressive	Breast	Induces apoptosis and growth arrest; Prevents GR-induced gene expression	Binds GR
linc-p21	Tumor suppressive	Mouse models of lung, sarcoma, lymphoma	Mediates p53 signaling; induces apoptosis	Binds hnRNP-k
MEG3	Tumor suppressive	Meningioma, hepatocellular, leukemia, pituitary tumors	Mediates p53 signaling; inhibits cell proliferation	Unknown
PTENP1	Tumor suppressive	Prostate, colon	Binds PTEN-suppressing miRNAs	Unknown

Biogenesis: Where are lncRNAs?

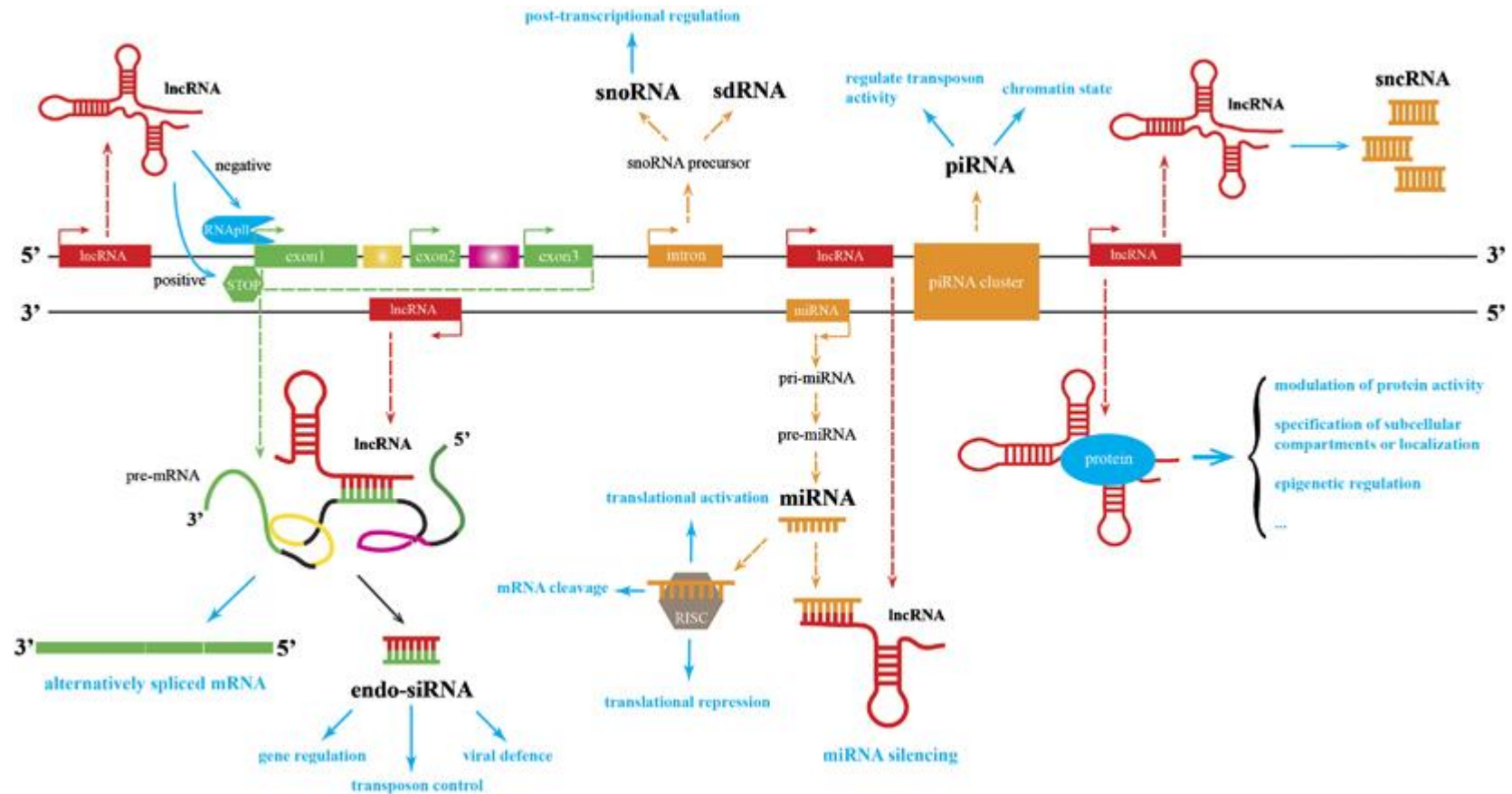


Legend:
Green = lncRNA,
Purple = Protein
Coding Gene

Biogenesis: Where are lncRNAs?



Λειτουργίες όπου συμμετέχουν τα lncRNAs



Λειτουργίες όπου συμμετέχουν τα lncRNAs

Τα lncRNAs επιτρέπουν στο κύτταρο:

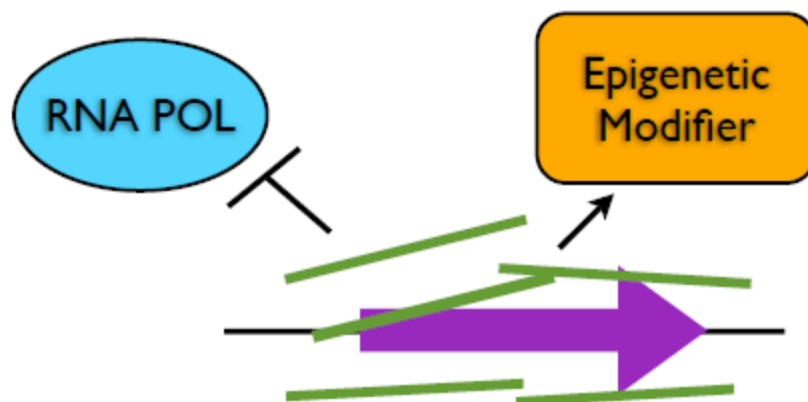
1) να ρυθμίζει με ακρίβεια την έκφραση γονιδίων σε ανταπόκριση ερεθισμάτων από το περιβάλλον ή

2) να αυξήσουν, να μειώσουν ή να αποσιωπίσουν την έκφραση ενός γονιδίου για την εξασφάλιση της ιστικής ομοιοστασίας στα πλαίσια των προγραμμάτων ανάπτυξης. Συγκεκριμένα συμμετέχουν:

- στον έλεγχο της κυτταρικής διαίρεσης, της ανάπτυξης, του κυτταρικού μεταβολισμού και στην πρόκληση ανθρώπινων ασθενειών
- στη ρύθμιση της μεταγραφής (δρουν είτε *cis* ή *trans*)
- στη ρύθμιση του ματίσματος (RNA splicing), της μεταφοράς RNA, της μετάφραση, της επεξεργασία των mRNA και στη σταθεροποίηση τους
- στη διαμόρφωση της χρωματίνης (δρουν είτε *cis* ή *trans*) και στην 3D οργάνωση του γενώματος και του πυρήνα
- ως υποστρώματα για τη συναρμολόγηση συμπλόκων RNA-πρωτεϊνών, ως προσδέτες (ligands) για πρωτεΐνες που συμμετέχουν στη γονιδιακή ρύθμιση και στη μεταφορά τους σε αλληλουχίες στόχους στο DNA ή σε άλλα RNA, ή ως παραπλανητικές αλληλουχίες για απομάκρυνση πρωτεϊνών που πλεονάζουν ή πρέπει να μειωθεί η δράση ή εντόπισή τους

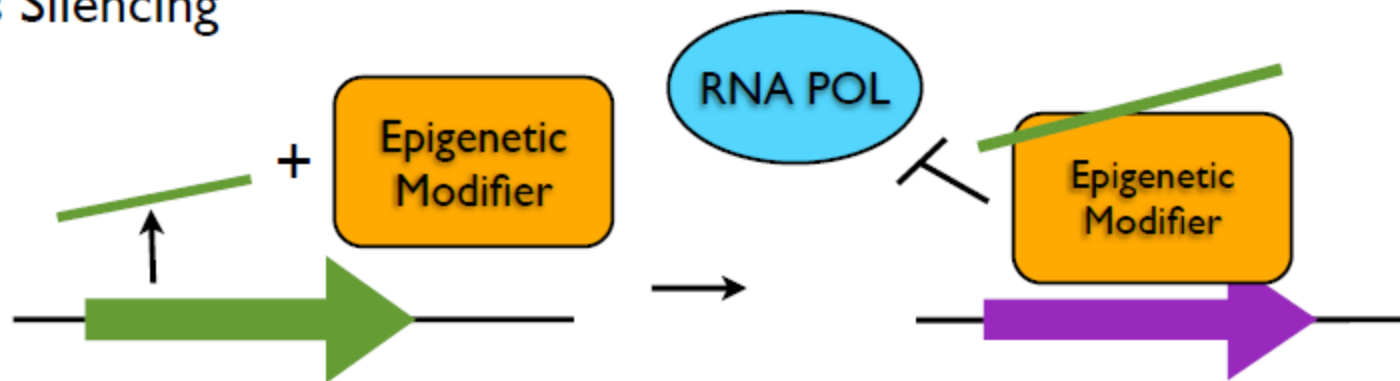
Mechanism of Action: Regulation of Chromatin Structure

Cis Silencing



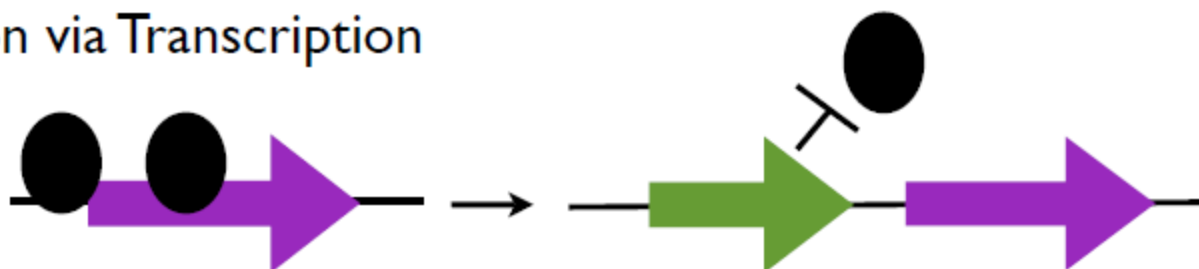
Legend:
Green = lncRNA,
Purple = Protein
Coding Gene

Trans Silencing

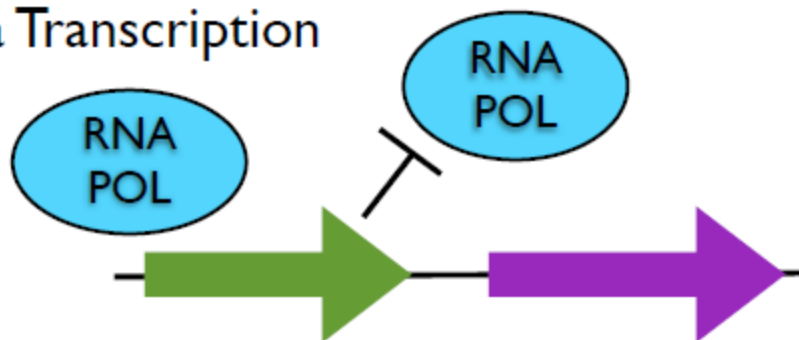


Mechanism of Action: Gene Regulation by lncRNA Transcription

Activation via Transcription

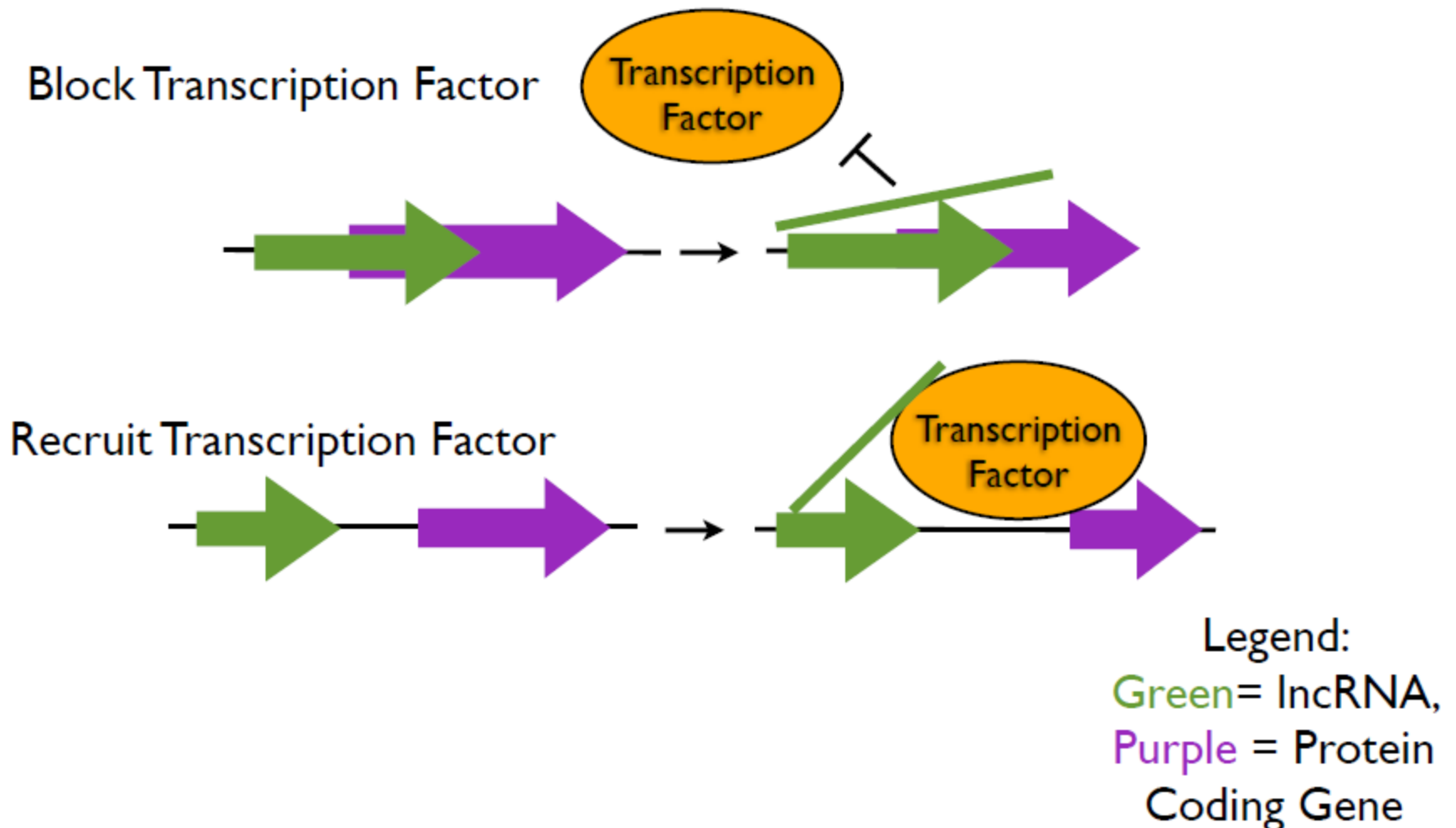


Silencing via Transcription



Legend:
Green = lncRNA,
Purple = Protein
Coding Gene

Mechanism of Action: Regulation of Transcription in cis



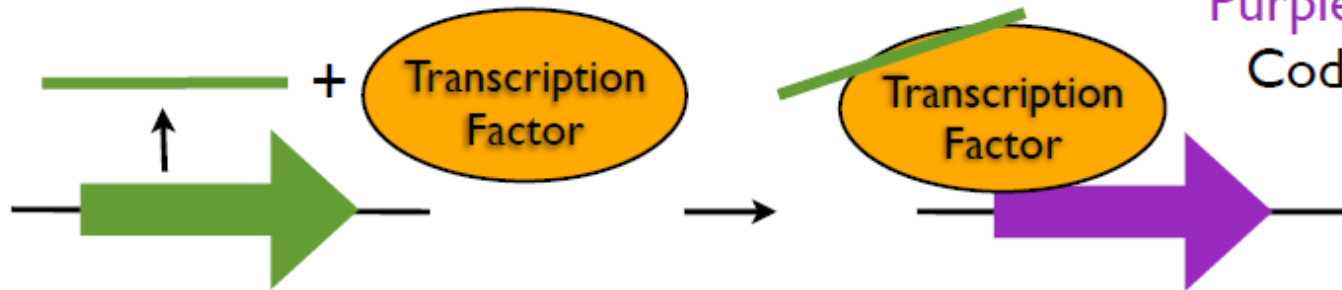
Mechanism of Action: Regulation of Transcription in trans

Legend:

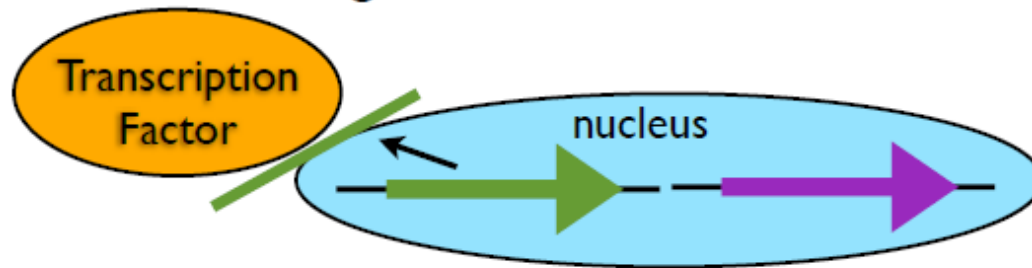
Green = lncRNA,

Purple = Protein
Coding Gene

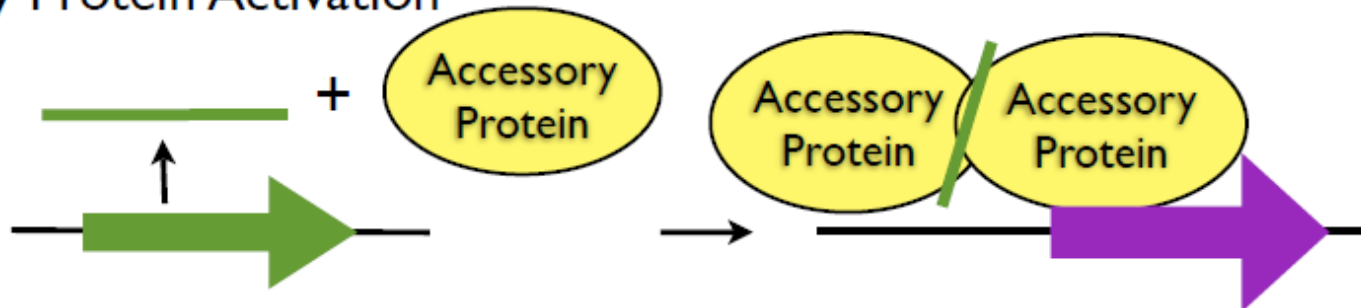
Transcription Factor Activation



Transcription Factor Trafficking

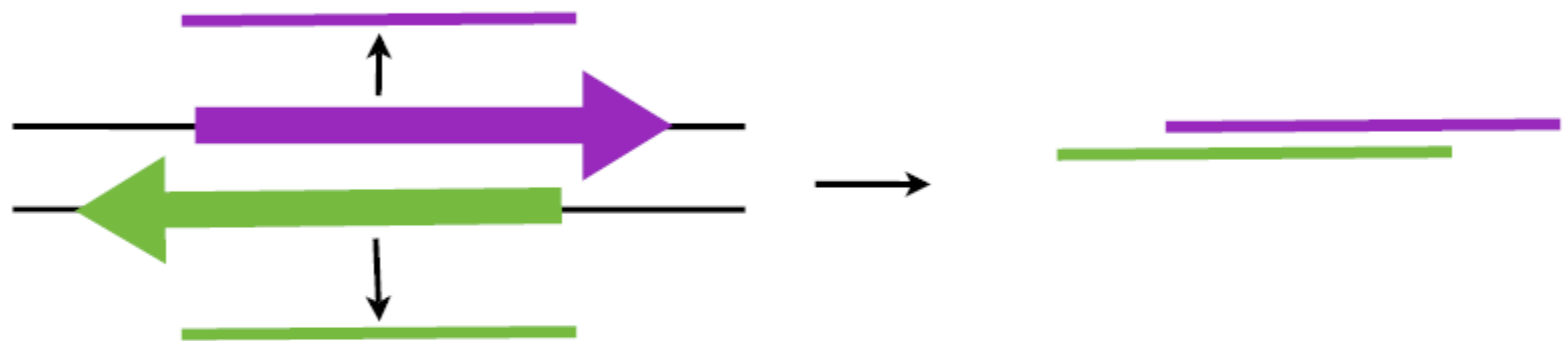


Accessory Protein Activation

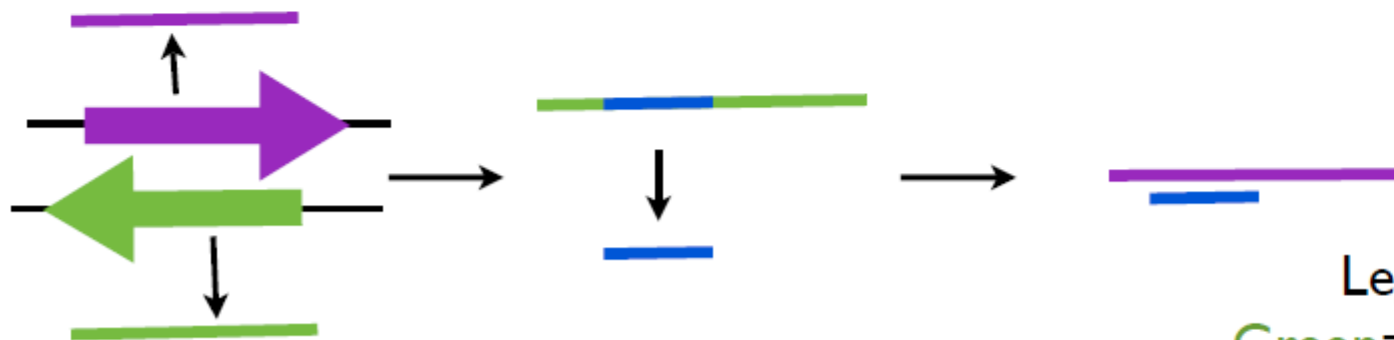


Mechanism of Action: Post Transcriptional Regulation

Regulation of mRNA Transcripts

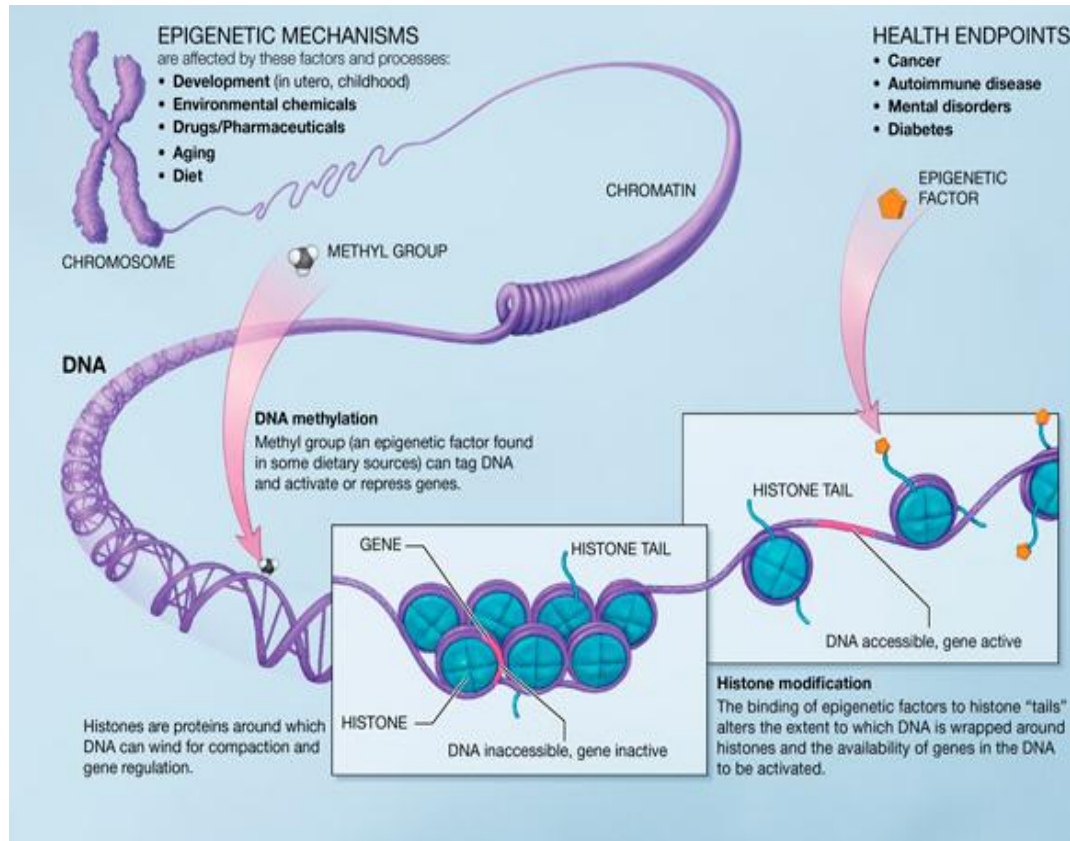


Gene Silencing Pathway

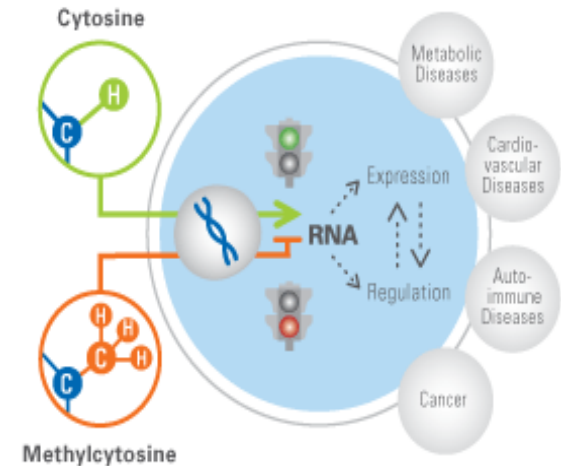


Legend:
Green = lncRNA,
Purple = Protein
Coding Gene

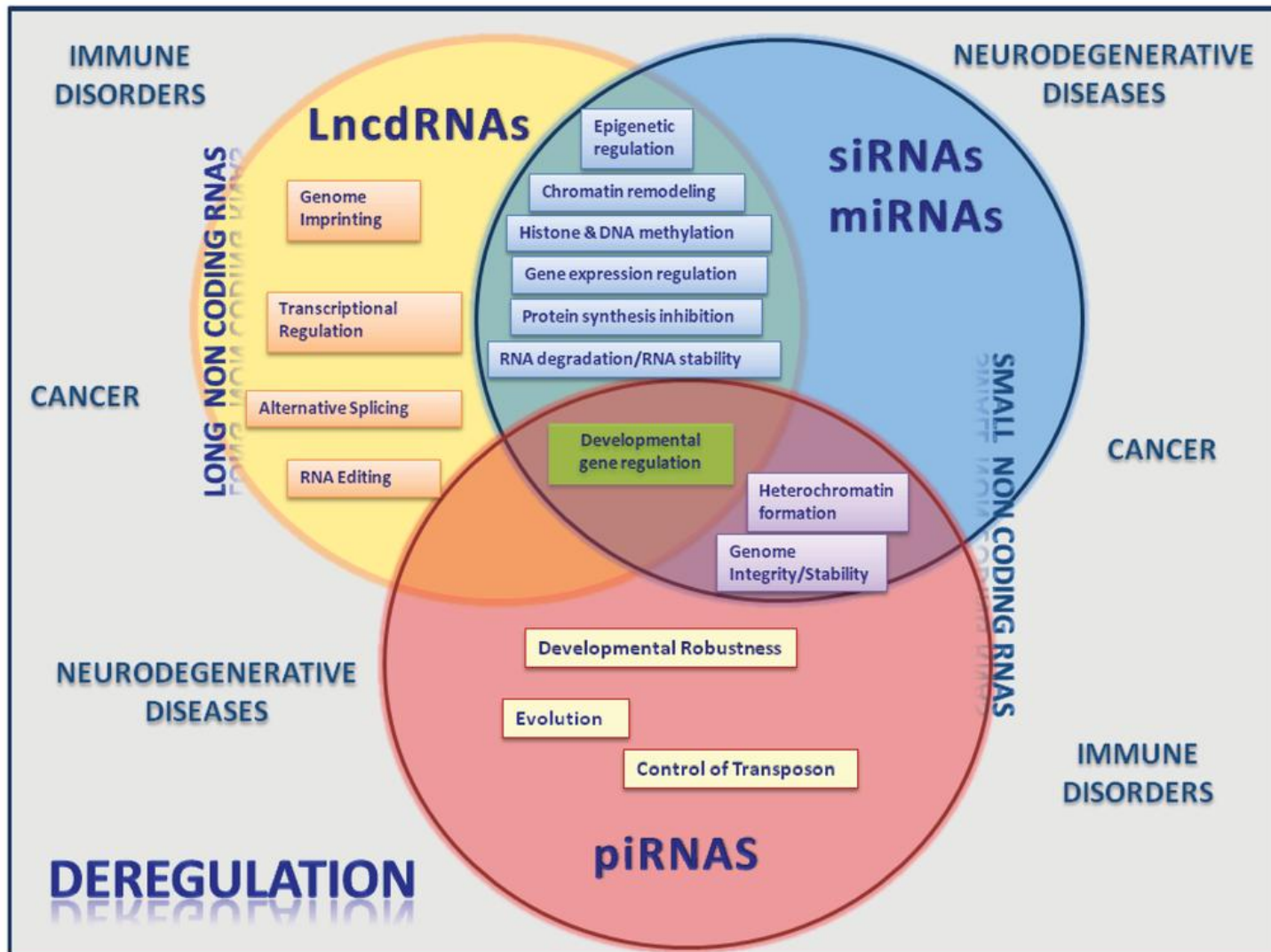
Επιγενετικοί μηχανισμοί και Παθολογία



METHYLATION



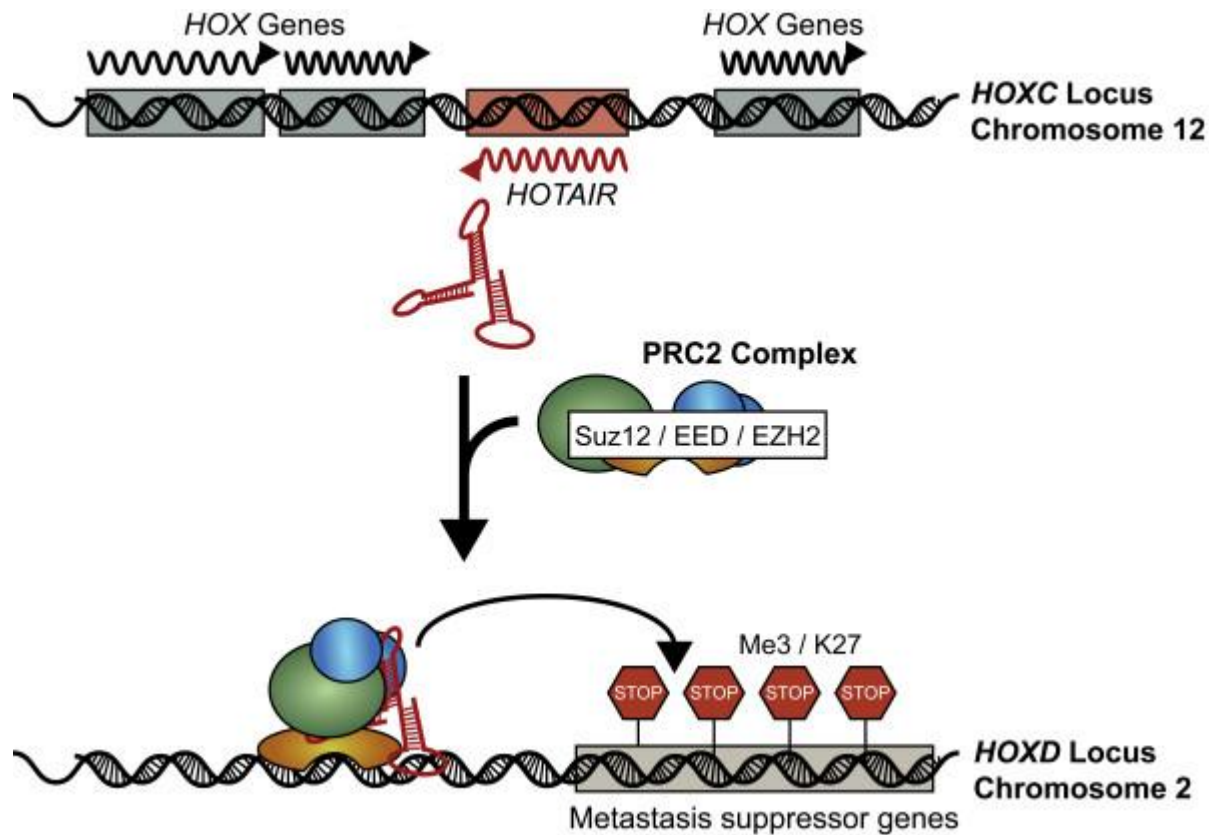
Επιγενετικοί μηχανισμοί και Παθολογία



HOTAIR: μεταγραφική αποσιώπηση

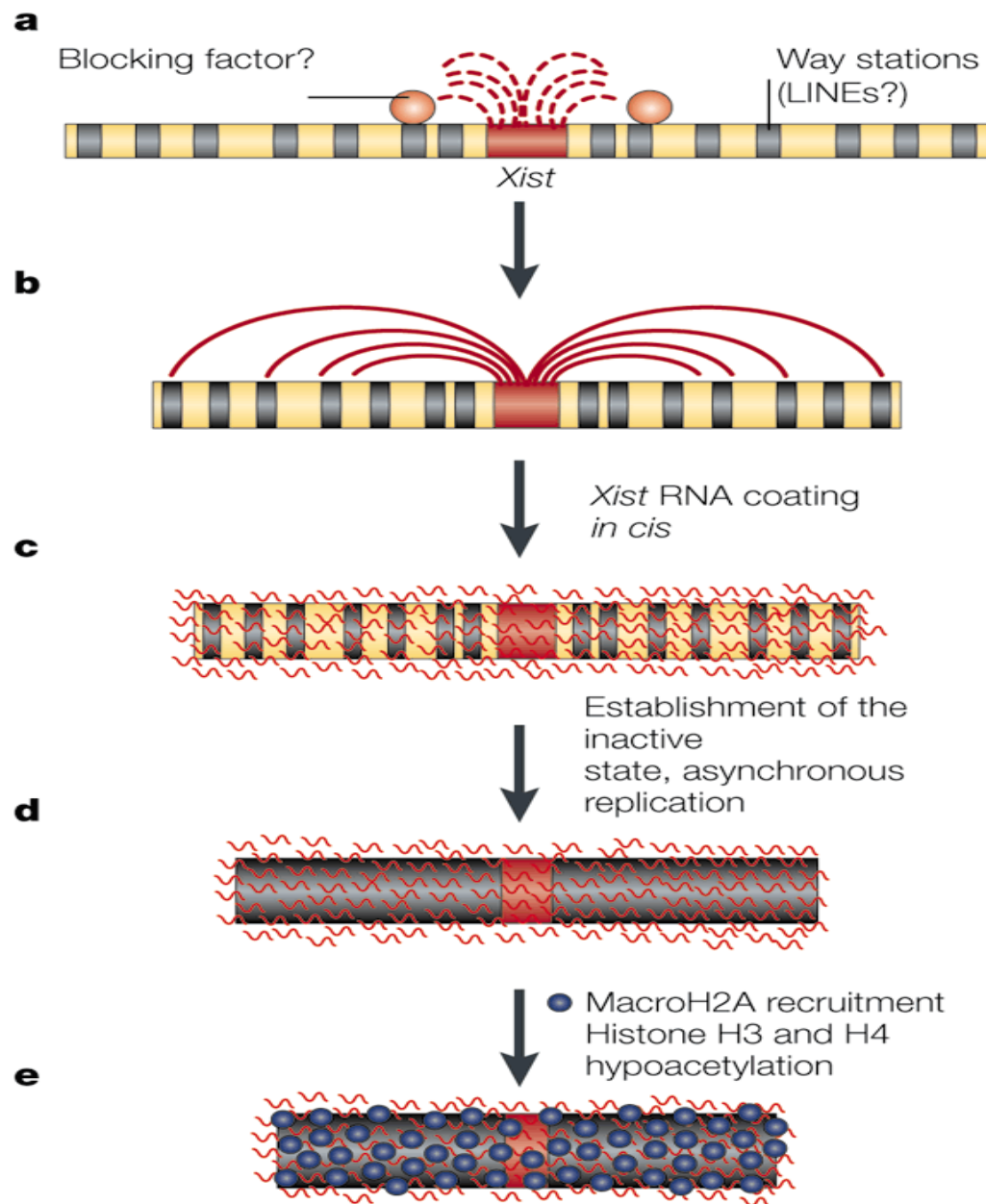
- **Ο HOTAIR (HOX transcript antisense RNA) γονιδιακός τύπος βρίσκεται στο χρωμόσωμα 12 του ανθρώπου**
- **Μετά τη μεταγραφή του δημιουργεί σύμπλοκο με την Suz-Twelve πρωτεΐνη και τον παράγοντα Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2)**
- **Εμπλοκή σε διαδικασία διαμόρφωσης της χρωματίνης μέσω αλληλεπίδρασης με την απομεθυλάση των ιστονών LSD1**
- **Προκαλεί αποσιώπηση του γονιδίου HOXD**

HOTAIR: μεταγραφική αποσιώπηση

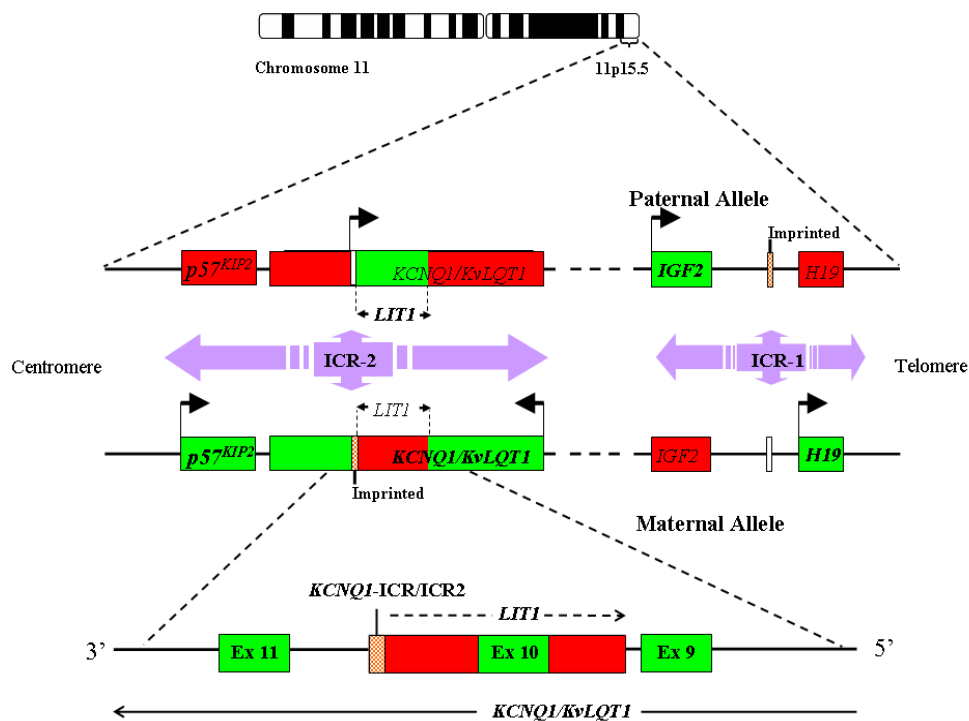


Αδρανοποίηση χρωμοσώματος X

- Τυχαία επιλογή του χρωμοσώματος Xi στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης για αδρανοποίηση (ετεροχρωματίνη)
- Συνεργασία μεταξύ γονιδίων *Xist* και *Tsix*
- Το γονίδιο *Xist* παράγει RNAs, τα οποία καλύπτουν το Xi γενικότερα και ειδικότερα καταστέλλει το γονιδιακό τόπο *Tsix* στο Xi.
- Στο ενεργό X χρωμόσωμα το *Tsix* αδρανοποιεί τα *Xist* RNAs
- Η αδρανοποίηση του Xi ολοκληρώνεται με μεθυλιώσεις και υποακετυλιώσεις

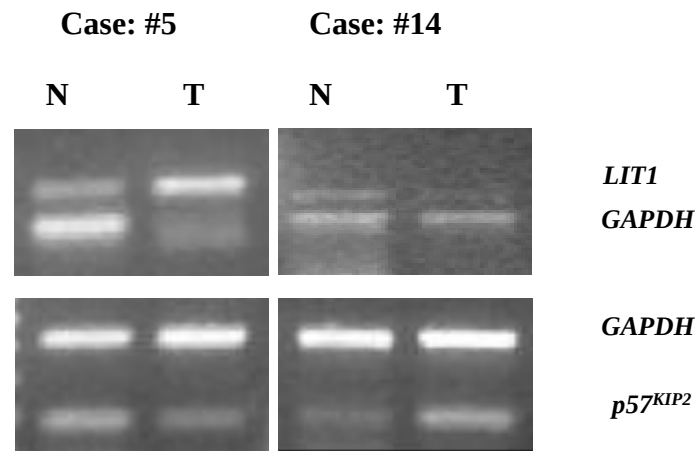


Γενωμικό εντύπωμα (imprinting) – μη κωδικοποιούμενο RNA στον καρκίνο



Pateras et al, *Mol Cancer Res*, 2009

LIT1 vs *p57^{KIP2}* expression in Lung Cancer



Pateras et al, *Int J Cancer*, 2006

Γενωμικό εντύπωμα (imprinting) – μη κωδικοποιούμενο RNA και διατροφή?



- Διαταραχές στη διαδικασία του εντυπώματος οδηγούν:
 - σε πολύ μεγάλο μέγεθος
 - αλλά και προβλήματα υγείας

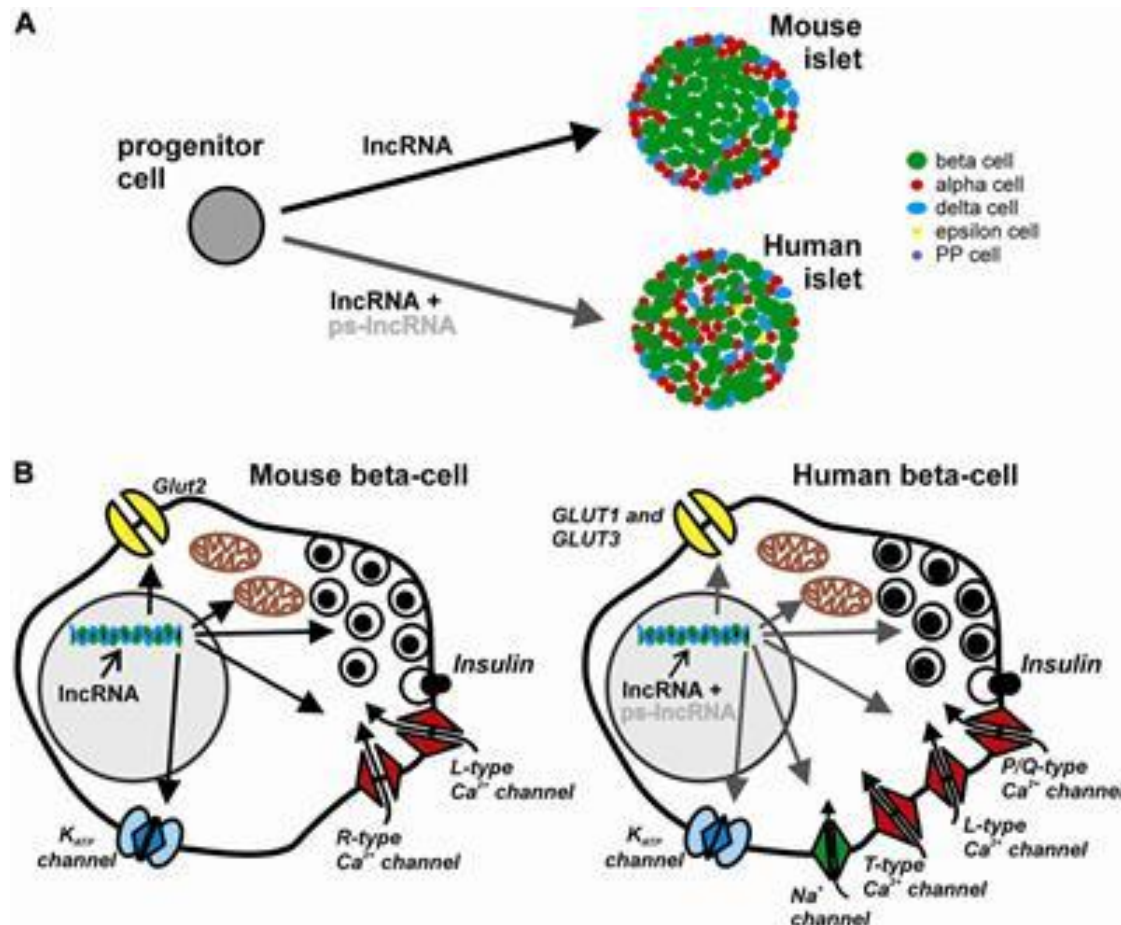
Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

- **Ιστοειδική ρύθμιση του μεταβολισμού**
 - **Ρύθμιση ιδιότητας των β-παγκρεατικών κυττάρων**
(>1000 lncRNAs έχουν ταυτοποιηθεί)
 - **Ρύθμιση της λιπογένεσης και της πλαστικότητας του**
λιπώδους ιστού
 - **Ρύθμιση της ανοσιακής απάντησης**

Kornfeld J-W, Bruning JC. Front Genet. 2014; 5: 57

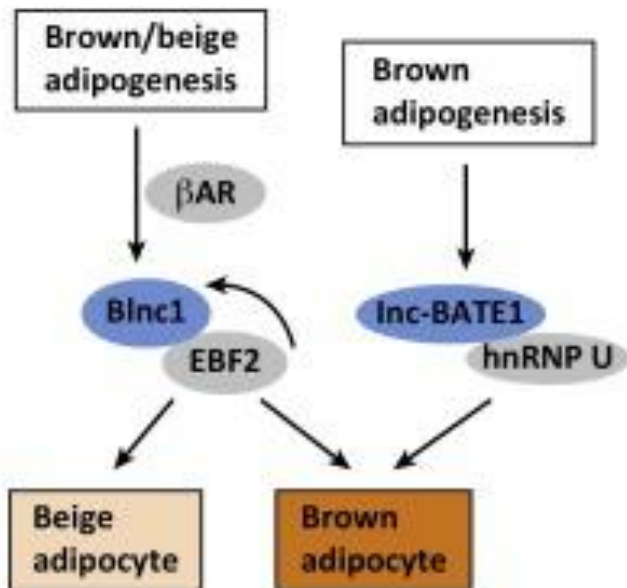
Zhao X-Y, Lin JD. Trends Biochem Sci. 2015; 40: 586

Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

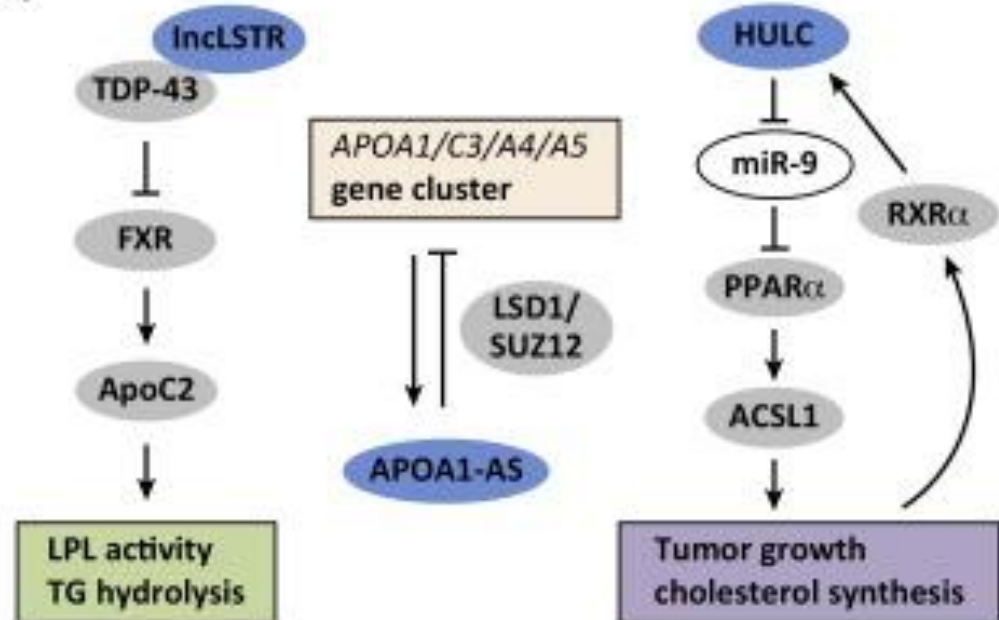


Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

(A)



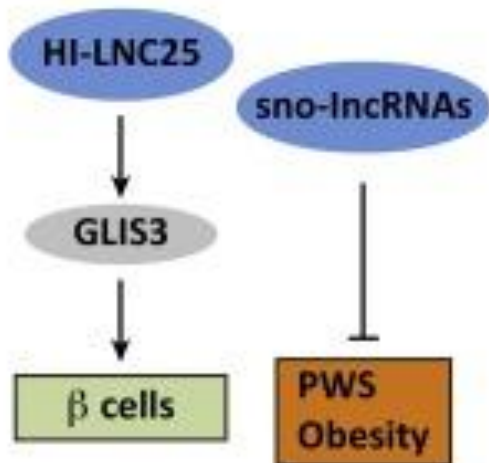
(B)



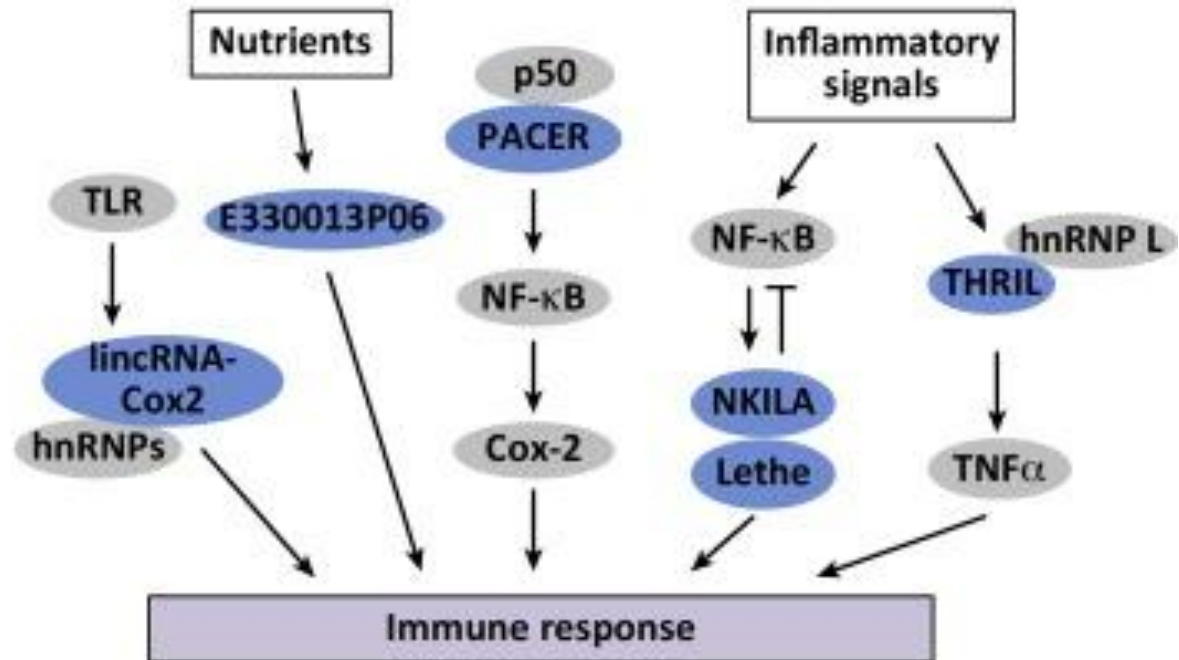
Trends in Biochemical Sciences

Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

(A)



(B)



Trends in Biochemical Sciences

Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

- **Colorectal neoplasia differentially expressed (CRNDE)**
είναι ένα γονίδιο το οποίο ενεργοποιείται πρώιμα στον
καρκίνο του παχέως εντέρου
- Είναι ένα lncRNA, η έκφραση του οποίου ρυθμίζεται από
τον άξονα insulin/IGFs
- Η υπερέκφραση του CRNDE προωθεί μεταβολικές
αλλαγές στα καρκινικά κύτταρα επιτρέποντάς τους τη
χρήση της γλυκόλυση (φαινόμενο Warburg)

Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

Cells exposed to hypoxic (low oxygen) conditions mount an adaptive response mediated by the hypoxia-inducible factor (HIF) family of transcription factors. A change associated with this hypoxic reprogramming is an increased dependence on glycolysis over oxidative phosphorylation, a metabolic shift called the Warburg effect, which is associated with tumor growth. With bioinformatic analysis, Yang et al. identified six long noncoding RNAs (lncRNA or lincRNA, depending on whether they are coded within a gene or intragenically, respectively) with hypoxia response elements in their promoters, and real-time reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) analysis in several human cells lines or a primary cell culture showed that only lincRNA-p21 was increased by hypoxia. Knockdown of lincRNA-p21 prevented hypoxia-induced changes in metabolism that were rescued by ectopic expression of HIF-1 α or a resistant lincRNA-p21 construct. In cells exposed to hypoxic conditions, knockdown of lincRNA-p21 decreased HIF-1 α protein and triggered more rapid degradation of HIF-1 α without altering the abundance of HIF-1 α -encoding mRNA. HIF-1 α was stabilized in cells with knockdown of both lincRNA-p21 and VHL, which is an E3 ubiquitin ligase that marks HIF-1 α for degradation by the ubiquitin-proteasomal pathway, suggesting that lincRNA-p21 interferes with this degradation pathway for HIF-1 α . Multiple in vitro binding assays indicated that lincRNA-p21 interacted with both HIF-1 α and VHL, and experiments with VHL deletion mutants suggested that lincRNA-p21 may bind to the HIF-1 α -binding regions of VHL and thus competitively inhibit the interaction between these two proteins. Knockdown of HIF-1 α reduced the hypoxia-induced increase in lincRNA-p21 abundance, and chromatin immunoprecipitation experiments and promoter reporter assays confirmed that lincRNA-p21 was a direct transcriptional target of HIF-1 α . In a xenograft model in which mice were injected with cells that had been exposed to hypoxia before injection, knockdown of lincRNA-p21 reduced tumor growth and changes in protein abundance associated with the Warburg effect. Thus, lincRNA-p21 functions as part of a positive feedback loop that increases HIF-1 α stability in response to hypoxia.

Μακρή μη-κωδικοποιό (long non-coding) RNA και μεταβολισμός

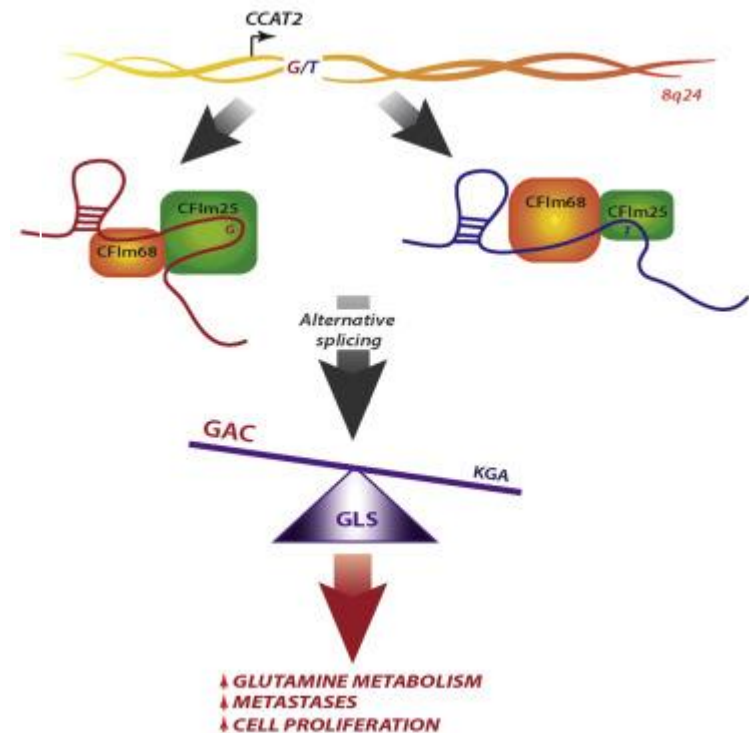
The lncRNA CCAT2 reprograms energy metabolism in an allele-specific manner

- CCAT2 alleles bind the CFIm complex with distinct affinities
- CCAT2-CFIm-GLS interaction regulates the alternative splicing of GLS
- This regulation axis is present in 61% of analyzed CRC cases

Summary

Altered energy metabolism is a cancer hallmark as malignant cells tailor their metabolic pathways to meet their energy requirements. Glucose and glutamine are the major nutrients that fuel cellular metabolism, and the pathways utilizing these nutrients are often altered in cancer. Here, we show that the long ncRNA *CCAT2*, located at the 8q24 amplicon on cancer risk-associated rs6983267 SNP, regulates cancer metabolism in vitro and in vivo in an allele-specific manner by binding the Cleavage Factor I (CFIm) complex with distinct affinities for the two subunits (CFIm25 and CFIm68). The *CCAT2* interaction with the CFIm complex fine-tunes the alternative splicing of *Glutaminase (GLS)* by selecting the poly(A) site in intron 14 of the precursor mRNA. These findings uncover a complex, allele-specific regulatory mechanism of cancer metabolism orchestrated by the two alleles of a long ncRNA.

DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.molcel.2016.01.015>





ΕΥΧΑΡΙΣΤΩ