



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΥΓΕΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΙΑΤΡΙΚΗΣ



ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΚΥΤΤΑΡΟΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ



ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
«ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΤΟΥ ΑΝΘΡΩΠΟΥ»

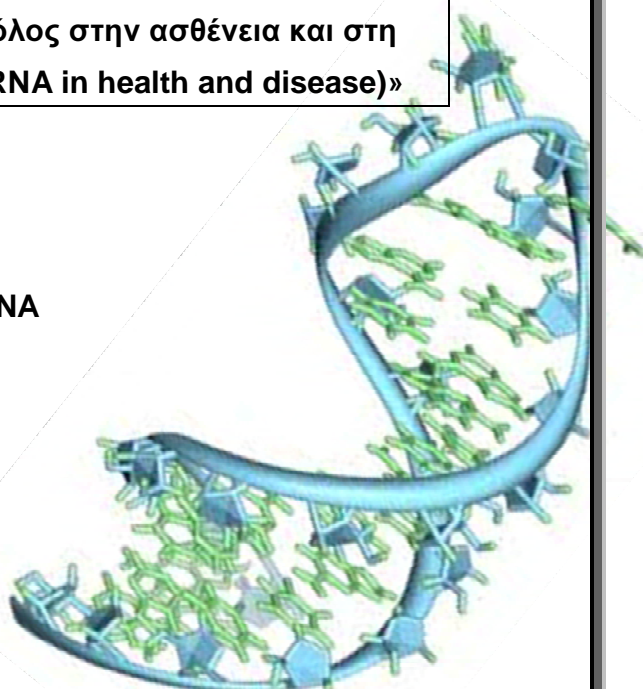
ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

«Μακρά μη- κωδικοποιούντα μόρια RNA: ρόλος στην ασθένεια και στη φυσιολογική κατάσταση (Long non-coding RNA in health and disease)»

ΡΑΦΑΗΛΙΔΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ

ΙΟΥΛΙΟΣ , 2014



ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ ΤΟΥ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Α. ΤΣΕΖΟΥ

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ – ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΠΘ

(Επιβλέπων/ουσα)

ΣΥΝΟΔΙΝΟΥ-ΤΡΑΕΓΕΡ ΙΩΑΝΝΑ-ΡΑΧΗΛ – ΑΝ. ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ ΕΚΠΑ (Συνεπιβλέπων/ουσα)

ΔΗΜΑΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ – ΕΠ. ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΠΘ

(Μέλος τριμελούς επιτροπής)

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο σημείο αυτό αισθάνομαι την ανάγκη να εκφράσω τις ειλικρινείς και θερμές ευχαριστίες μου σε όσους συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της προσπάθειας.

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κ. ΣΥΝΟΔΙΝΟΥ-ΤΡΑΕΓΕΡ ΙΩΑΝΝΑ-ΡΑΧΗΛ που με την σωστή καθοδήγηση και υπομονή της έκανε πιο προσιτή την εκπόνηση αυτής της εργασίας.

Έπειτα, θα ήθελα να ευχαριστήσω την Κ. ΤΣΕΖΟΥ ΑΣΠΑΣΙΑ που με το πάθος της γι' αυτό το μεταπτυχιακό πρόγραμμα και γενικότερα για τον τομέα της γενετικής, με παρακίνησε να προσπαθώ όλο και περισσότερο.

Και τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω για την ατελείωτη στήριξή τους, τον πατέρα μου Νίκο, την μητέρα μου Αναστασία, την αδερφή μου Μαρία και για την συνεχή της ενθάρρυνση την παιδική μου φίλη Μαίρη...

ΡΑΦΑΗΛΙΔΟΥ ΑΘΗΝΑ

ΛΑΡΙΣΑ, 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ	
1.1 Ιστορική Αναδρομή	9
1.2 Διάχυτη μεταγραφή : Χρήσιμα σκουπίδια ή μεταγραφικός θόρυβος;	10
1.3 Γονιδιωματικά πλαίσια	12
1.3.1 «Ανεξάρτητα» lncRNAs	13
1.3.2 Φυσικά antisense μεταγραφήματα (NATs)	13
1.3.3 Ψευδογονίδια	14
1.3.4 Divergent transcripts : Μεταγραφήματα σχετιζόμενα με υποκινητές και RNA ενισχυτές	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ lncRNAs	
2.1 lncRNAs : Τι είναι, Που είναι και Γιατί είναι;	15
2.1.1 Κοινά χαρακτηριστικά lncRNAs και mRNAs	19
2.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ : ΤΥΠΟΣ Ι : Σήματα	20
2.2.1 Ειδικότητα αλληλομόρφων	21
2.2.3 Ανατομική ειδική έκφραση	22
2.2.3 Επαγωγή από βλάβη DNA	23
2.2.4 Πολυδυναμικότητα και επαναπρογραμματισμός	24
2.2.5 Συντονισμένη δράση από τα eRNAs (enhancer RNAs)	25
2.2.6 Ανιχνευτής επανάληψης	26

2.3 ΤΥΠΟΣ II : Παγίδες	27
2.3.1 DHFR (human dihydrofolate reductase)	27
2.3.2 TERRA : Τελομερή	28
2.3.3 MALAT 1 (metastasis – associated lung adenocarcinoma transcript 1)	29
2.3.4 PANTA (P21 associated ncRNA DNA damage activated)	29
2.3.5 Gas5 : Υποδοχέας γλυκοκορτικοειδών	30
2.4 ΤΥΠΟΣ III : Οδηγοί	31
2.4.1 Οδηγοί in cis	32
2.4.2 Οδηγοί in trans	35
2.5 ΤΥΠΟΣ IV : Ικρίώματα	35
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΓΝΩΣΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ LncRNAs	
3.1 Πόσα είναι τα λειτουργικά lncRNAs που δίνουν το παρόν στα θηλαστικά	38
3.1.1 Γνωστές βιολογικές λειτουργίες των lncRNAs	40
3.2 Περισσότερα από δύο είδη RNA ενεργοποιητών	40
3.2.1 Enhancer – associated long non coding RNAs	41
3.2.2 LincRNAs (long intergenic ncRNAs)	42
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 : ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ	43
4.1 Γονιδιωματική αποτύπωση	43
4.1.1 Συγγενείς παθήσεις της αποτύπωσης	46
4.2 X inactivation	48

4.2.1 Xist και Καρκίνος	48
4.2.2 X – Συνδεδεμένες επιρροές, νόηση και συμπεριφορά	51
4.3 Επιγενετικός επαναπρογραμματισμός σε ανθρώπινα βλαστικά κύτταρα	53
4.4 HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA)	57
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΠΟΙΑ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΑ LncRNAs	
5.1 Διατήρηση σηματοδότησης πολλαπλασιασμού	58
5.2 Αποφυγή ανάπτυξης καταστολέων	59
5.3 Ενεργοποίηση αθανασίας	61
5.4 Ενεργοποίηση εισβολής και μετάσταση	62
5.5 Πρόκληση αγγειογένεσης	63
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	66
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	68

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος των ευκαρυωτικών οργανισμών μεταγράφεται, αποδίδοντας ένα περίπλοκο δίκτυο των μεταγραφημάτων που περιλαμβάνει δεκάδες χιλιάδες μακρά μη κωδικοποιούντα RNAs με ελάχιστη ή καμία ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεΐνης. Παρόλο που η συντριπτική πλειοψηφία των lncRNAs ακόμη χαρακτηρίζεται διεξοδικά, πολλά από αυτά τα μετάγραφα είναι απίθανο να αντιπροσωπεύουν μεταγραφικό «θόρυβο» από τη στιγμή που εμφανίζουν τυπο-ειδική έκφραση, εντοπισμό σε υποκυτταρικά διαμερίσματα και σύνδεση με ανθρώπινες ασθένειες. Σε ορισμένες, περιπτώσεις φαίνεται ότι απλά η πράξη της μεταγραφής των μη κωδικοποιούντων RNA επαρκεί για να επηρεάσει θετικά ή αρνητικά την έκφραση των γονιδίων σε κοντινή απόσταση. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις, τα lncRNAs εξυπηρετούν από μόνα τους βασικούς ρυθμιστικούς ρόλους που προηγουμένως προορίζονταν για τις πρωτεΐνες, όπως η ρύθμιση της δραστηριοποίησης και του εντοπισμού των πρωτεϊνών και χρησιμεύουν ως οργανωτικά πλαίσια των υποκυτταρικών δομών. Τα lncRNAs είναι αμετάφραστα μεταγραφήματα, έχουν μέγεθος τουλάχιστον 200 νουκλεοτιδίων, έχουν πολλά από τα δομικά χαρακτηριστικά των mRNAs, συμπεριλαμβανομένης της πολυA ουράς, κάλυψη στο 5' άκρο (5' capping), μία δομή υποκινητή αλλά δεν διαθέτει ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) και τέλος, ταξινομούνται βάση της θέσης τους σε σχέση με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες: μεταξύ των γονιδίων (διαγονιδιακά), μέσα στα γονίδια ή ενδογονιδιακά (intragenic/intronic) και από αντίστροφη μεταγραφή (antisense). Οι αρχικές προσπάθειες για να χαρακτηριστούν αυτά τα μόρια απέδειξαν ότι λειτουργούν *in cis*, ρυθμίζοντας άμεσα τους γονιδιωματικούς γείτονές τους, όπως συμβαίνει τα εξής lncRNAs: AIR, XIST και Kcnq1ot, τα οποία προσλαμβάνουν τα τροποποιητικά σύμπλοκα της χρωματίνης για να αποσιωπήσουν τους παρακείμενους χώρους. Το πεδίο εφαρμογής των lncRNAs στη ρύθμιση των γονιδίων προωθήθηκε με τη διαπίστωση ότι το lncRNA HOTAIR παρουσιάζει *trans* ρυθμιστικές ικανότητες.

Η αδρανοποίηση του Χ χρωμοσώματος και η γονιδιωματική αποτύπωση είναι κλασικές επιγενετικές διεργασίες που προκαλούν νόσους, όταν δεν ρυθμίζονται σωστά στα θηλαστικά. Εκτιμώντας την αδρανοποίηση του Χ χρωμοσώματος η οποία λειτουργεί για να λύσει το πρόβλημα της δοσολογίας των γονιδίων του Χ χρωμοσώματος, ο σκοπός της γονιδιωματική αποτύπωσης παραμένει αμφιλεγόμενος. Παρ' όλα αυτά, τα δύο φαινόμενα ενώνονται από τον έλεγχο των αλληλίων των μεγάλων ομάδων των γονιδίων, έτσι ώστε μόνο ένα αντίγραφο ενός γονιδίου να εκφράζεται σε κάθε κύτταρο. Η ρύθμιση των αλληλίων θέτει σημαντικές προκλήσεις, επειδή απαιτεί συντονισμένο έλεγχο μεγάλου εύρους in cis και σταθερή διάδοση πάνω στο χρόνο. Τα lncRNAs έχουν αναδειχθεί ως ένα κοινό θέμα, καθώς και η συμβολή τους σε ασθένειες και στο χρωμόσωμα Χ κατά την αδρανοποίηση έχουν γίνει εμφανή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 : ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Ιστορική αναδρομή των lncRNAs

Παρ' όλο που το φαινόμενο των lncRNAs είναι σχετικά πρόσφατο, αποσπρά μεγάλη προσοχή και εντάσσεται στο ευρύτερο ιστορικό ενδιαφέρον, μελετώντας το μέγεθος, την εξέλιξη και την λειτουργία του γονιδιώματος. Από το 1950, το C-value, ή η ποσότητα του DNA στο απλοειδές γονιδίωμα (δηλ. το μέγεθος του γονιδιώματος), έχει αποδειχθεί ότι εμφανίζουν μικρή συσχέτιση με το μέγεθος του οργανισμού ή την πολυπλοκότητα της ανάπτυξης (Gall, 1981; Mirsky & Ris, 1951; Thomas, 1971). «Κατώτερα» είδη ζώων όπως η σαλαμάνδρα μπορεί να έχει 15 φορές μεγαλύτερο γονιδίωμα από «ανώτερα» ζώα, όπως ο άνθρωπος (Gall, 1981). Το «C-value paradox» που μόλις αναφέρθηκε (Thomas, 1971) είχε μπερδέψει τους επιστήμονες για την ανθρωποκεντρική άποψη: « Όντας λίγο σοβινιστικοί για το δικό μας είδος, μας αρέσει να πιστεύουμε ότι ο άνθρωπος είναι σίγουρα ένα από τα πιο περίπλοκα είδη στη γη, και ως εκ τούτου χρειάζεται το μέγιστο αριθμό γονιδίων» (Comings, 1972). Όλη αυτή η υπόθεση ξεκαθάρισε αναμφισβήτητα με την ανακάλυψη ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος δεν κωδικοποιεί πρωτεΐνες, βασιζόμενο στα πειράματα υβριδισμού στο DNA και RNA (Lewin, 1980) και με τον υπολογισμό των μεταλλάξεων στο γονιδίωμα (δηλ. το κόστος της εξέλιξης βάσει των επιβλαβών μεταλλάξεων, οι οποίες εξαρτώνται από τον ρυθμό μετάλλαξης σε κάθε γονίδιο και τον αριθμό των γονιδίων) (Ohno, 1972). Το 1970 είχε καθοριστεί ότι ο άνθρωπος ήταν απίθανο να έχει πάνω από 20.000-30.000 γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, που παραδόξως οι εκτιμήσεις τους ήταν κοντά με την τρέχουσα εκτίμηση (σε αντίθεση με τις υπερεκτιμήσεις των 50.000-100.000 του Human Genome Project) (Perteau & Salzberg, 2010). Ο εναπομείναν μη κωδικοποιητικός χώρος ονομάστηκε «junk DNA» (Comings, 1972; Lewin, 1980) λόγω του συντριπτικού φορτίου των μεταθετών, ψευδογονιδίων και απλών επαναλήψεων (συνολικά 50-70% του ανθρώπινου γονιδιώματος (de Koning et al, 2011)). Παρά την ονομασία του ως «junk», οι μη κωδικοποιούσες αλληλουχίες λαμβάνουν συνεχώς τεράστιο

ενδιαφέρον από το 1970 μέχρι και σήμερα. Πρωτοπόροι είχαν την προνοητικότητα να συνειδητοποιήσουν ότι «το ότι είναι σκουπίδια δεν σημαίνει ότι είναι και τελείως άχρηστα» (Comings, 1972), και «θα ήταν έκπληξη αν ο οργανισμός ξενιστής δεν βρει περιστασιακά κάποια χρήση για ένα τμήμα από αυτές τις αλληλουχίες» (Orgel & Crick, 1980). Ανάμεσα σε ένα πλήθος υποθετικών λειτουργιών είναι οι χρωμοσωμικές αντιστοιχίες, η ακεραιότητα του γονιδιώματος, η γονιδιακή ρύθμιση, το μεταφορικό RNA (mRNA) και η χρησιμότητά του ως δεξαμενή για την εξέλιξη (Britten & Davidson, 1971; Comings, 1972; John & Miklos, 1979; Lewin, 1980; Lewin, 1982; Orgel & Crick, 1980; Yunis & Yasmineh, 1971)

1.2 Διάχυτη μεταγραφή: χρήσιμα σκουπίδια ή μεταγραφικός θόρυβος;

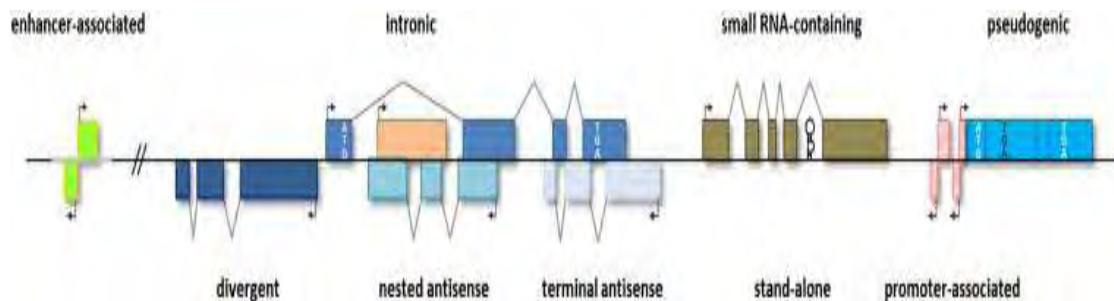
Κατά τη δεκαετία του '70 άρχισαν οι υπαινιγμοί ότι το μεγαλύτερο μέρος του γονιδιώματος μεταγράφεται για να αποδοθούν κωδικοποιητικά γονίδια και διάφορα γνωστά RNA όπως τα tRNA και rRNA. Αυτά τα αυτοαποκαλούμενα «ετερογενή πυρηνικά RNA» (hnRNA) μεταγράφονται από επαναλαμβανόμενες και ετεροχρωματικές περιοχές, καθώς και ανοδικά από το 20% των μη επαναλαμβανόμενων περιοχών στο γονιδίωμα των θηλαστικών (10 φορές περισσότερο από την μεταγραφή σε mRNA). Ήταν επίσης γνωστό ότι το 50% των hnRNA περιορίζονται στον πυρήνα και δεν περιέχουν αλληλουχίες κωδικοποίησης (Holmes et al, 1972; Lewin, 1980; Pierpont & Yunis, 1977). Τα ιντρόνια ανακαλύφθηκαν το 1977 (Berget et al, 1977; Chow et al, 1977) και αντιπροσώπευαν μόνο ένα μικρό μέρος των μη-κωδικοποιητικών αλληλουχιών. Λίγο αργότερα, στην δεκαετία του '80, τα snRNAs και snoRNAs αναγνωρίστηκαν ως σημαντικοί μεταγραφικοί παράγοντες στην μεταγραφική επεξεργασία του RNA. Ωστόσο, η υπόθεση της «διάχυτης μεταγραφής» δεν είχε εκτιμηθεί πλήρως μέχρι την άφιξη των τεχνολογιών ανάλυσης ολόκληρου του γονιδιώματος στα τέλη της δεκαετίας του 1990 και αρχές της δεκαετίας του 2000. Σύμφωνα με τον υβριδισμό των μικροσυστοιχιών και τις βαθιές αναλύσεις της αλληλουχίας, πλέον εκτιμάται ότι 70-90% του γονιδιώματός μας μεταγράφεται κατά τη διάρκεια της

ανάπτυξης (Bertone et al, 2004; Birney et al, 2007a; Carninci et al, 2005; Djebali et al, 2012; Kapranov et al, 2010; Mercer et al, 2012; Okazaki et al, 2002a; Ota et al, 2004; Rinn et al, 2003). Ωστόσο, θα πρέπει να επισημανθεί ότι η ιδέα της διάχυτης μεταγραφής, παρόλο που έχει γίνει αρκετά δημοφιλής, έχει αμφισβητηθεί με μία σειρά από αιτίες, συμπεριλαμβανομένης του χαμηλού ποσοστού διατήρησης μεταξύ των ειδών (Wang et al, 2004) και των εξαιρετικά χαμηλών επιπέδων έκφρασης σε πολλά μεταγραφήματα. Πρόσφατα εντοπίστηκαν μερικά μεταγραφήματα τα οποία υπολογίζετε να είναι παρόντα σε τόσο χαμηλά όσο 0,0006 αντίγραφα ανά κύτταρο (Mercer et al, 2012). Υπήρξε επίσης κριτική για τους τεχνικούς περιορισμούς με τα πλακάκια μικροσυστοιχιών, συμπεριλαμβανομένων των προβλημάτων με τα ψευδώς θετικά αποτελέσματα, το χαμηλό δυναμικό εύρος, την ανάλυση και την μικρή συμφωνία των διάφορων μελετών (Agarwal et al, 2010; van Bakel et al, 2010; van Bakel et al, 2011). Μερικές αναλύσεις υψηλής απόδοσης της RNA αλληλουχίας (RNA-Seq) δείχνουν ότι ένα μεγάλο μέρος της μεταγραφής μπορεί να εξηγηθεί από το εναλλακτικό μάτισμα ή από τις επεκτάσεις των γνωστών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (He et al, 2008; Mortazavi et al, 2008; Sultan et al, 2008). Αποδείξεις που υποστηρίζουν την ύπαρξη μη-κωδικοποιητικών μεταγραφημάτων σε διαγονιδιακές περιοχές, έχουν προέλθει από τις συσχετίσεις με την υπογραφή της χρωματίνης, όπως η υπερευαισθησία της DNAase1, οι τροποποιήσεις των ιστονών H3K9ac, H3K4me3 και H3K36me3, ή η πρόσδεση των μεταγραφικών παραγόντων (TFs) και η εξάρτηση των επιπέδων έκφρασης των TFs (Bernstein et al, 2012; Guttman et al, 2009a; Guttman et al, 2011). Το μεγαλύτερο ερώτημα, τότε και τώρα, είναι εάν αυτή η μεταγραφική δραστηριότητα εξυπηρετεί οποιαδήποτε βιολογική λειτουργία. Νωρίς το 1961, ο Jacob και Monod όταν ανακάλυψαν το mRNA και ανέπτυξαν το μοντέλο καταστολέα-φορέα στη ρύθμιση των γονιδίων, σκέφτηκαν ότι ο καταστολέας θα μπορούσε να είναι ένα μόριο RNA (Jacob & Monod, 1961). Το 1969, ο Britten και Davinson έθεσαν ένα μοντέλο για τη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης στα ευκαρυωτικά κύτταρα, όπου τα ncRNAs ενεργούν ως διαμεσολαβητές για να μεταφέρουν σήματα, τα οποία περιήλθαν από τους γενετικούς αισθητήρες στους υποδοχείς που

επηρεάζουν την κωδικοποίηση της παραγωγής γονιδίου (Britten & Davidson, 1969). Ορισμένοι από τους πρώτους ειδικούς ρυθμιστικούς ρόλους των lncRNAs ανακαλύφθηκαν στις αρχές του 1990, με την ανακάλυψη ότι τα lncRNAs εμπλέκονται στην επιγενετική ρύθμιση, όπως το H19 (Brannan et al, 1990) και Xist (Brockdorff et al, 1992; Brown et al, 1992).

1.3 Γονιδιωματικά πλαίσια των lncRNAs

Ένας τρόπος για να ταξινομήσουμε τα lncRNAs, είναι να τα κατατάξουμε ανάλογα με την γονιδιωματική τους θέση (δηλαδή από το σημείο του γονιδιώματος που μεταγράφονται). Με αυτόν τον τρόπο μπορούν να ομαδοποιηθούν σε πέντε κατηγορίες, όχι ειδικές. Βέβαια, η προσέγγιση αυτή δεν δίνει καμία πληροφορία για την λειτουργία ή την εξελικτική προέλευση των lncRNAs (εικόνα 1).



Εικόνα 1. Γονιδιωματικά πλαίσια των lncRNAs. Τα lncRNAs μπορεί να είναι αυτόνομες μονάδες μεταγραφής ή μπορούν να μεταγράφονται από ενισχυτές (eRNAs), υποκινητές (TSSa-RNAs, uaRNAs, pasRNAs και PROMPTs), ή ιντρόνια άλλων γονιδίων (στην περίπτωση αυτή ένα γονίδιο που κωδικοποιεί πρωτεΐνη με κωδικόνιο έναρξης ATG και κωδικόνιο λήξης TGA σε λευκό χρώμα), από ψευδογονίδια (εδώ εμφανίζονται με ένα πρόωρο κωδικόνιο λήξης TGA σε μαύρο) ή antisense σε άλλα γονίδια (NATs) με διάφορους βαθμούς επικάλυψης, από κανένα (divergent), σε μερική (terminal), σε ολοκληρωμένη (nested). Τα lncRNAs μπορούν επίσης να φιλοξενήσουν ένα ή περισσότερα small RNAs (μαύρη φουρκέτα) εντός της μονάδας μεταγραφής τους.

Copyright © 2013 by the Genetics Society of America

1.3.1 «Ανεξάρτητα» lncRNAs

Αυτά τα lncRNAs είναι ξεχωριστές μονάδες μεταγραφής που βρίσκονται σε χώρους αλληλουχίας που δεν συμπίπτουν με τα γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Μερικά από αυτά αναφέρονται ως “lincRNAs” , δηλαδή «μεγάλα διαγονιδιακά ή παρεμβατικά ncRNAs» (Cabili et al, 2011; Guttman et al, 2009a; Ulitsky et al, 2011). Πολλά από αυτά μεταγράφονται από την RNA Pol II, πολυαδενυλιώνονται και υπόκεινται μάτισμα (συνήθως με εναλλακτικές ισομορφές, αλλά με λιγότερα εξόνια απ’ ότι τα κωδικοποιητικά mRNA) και έχουν μήκος κατά μέσο όρο 1kb. Γνωστά παραδείγματα είναι το Xist (Brockdorff et al, 1992), H19 (Brannan et al, 1990), HOTAIR (Rinn et al, 2007a), MALAT1 (Ji et al, 2003).

1.3.2 Φυσικά antisense μεταγραφήματα (NATs)

Έντονη δραστηριότητα μεταγραφής φαίνεται να λαμβάνει χώρα στον απέναντι από τον sense (known transcripts) DNA κλώνο, όπου έχουμε στο 70% των γνωστών μεταγραφημάτων (sense) αντίστοιχα ομόλογα (antisense) (Katayama et al, 2005). Η επικάλυψη μεταξύ αυτών των sense-antisense ζευγών (SAS) μπορεί να είναι πλήρης με το ένα μεταγράφημα να είναι τοποθετημένο μέσα στο άλλο, αλλά τα φυσικά antisense μεταγραφήματα (NATs) τείνουν κυρίως να εμπλουτίζονται στα 5’ (υποκινητή) και 3’(τερματισμού) άκρα της sense μεταγραφής. Υπάρχει ένας αριθμός από καλά τεκμηριωμένα ζεύγη SAS που σχηματίζονται από δύο κωδικοποιητικά mRNAs, καθώς και διπλά ζεύγη lncRNA SAS όπως τα Xist-Tsix, δύο RNA που ελέγχουν την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος (Lee et al, 1999).

1.3.3 Ψευδογονίδια

Αυτά είναι τα υπολείμματα των γονιδίων που έχουν χάσει την ικανότητα κωδικοποίησης τους λόγω μετατόπισης του πλαισίου ή λόγω μεταλλάξεων (Pink et al, 2011). Έχει βρεθεί ότι ορισμένα ψευδογονίδια ρυθμίζουν την γονιδιακή έκφραση με επιγενετικούς ή μετα-μεταγραφικούς μηχανισμούς. Θεωρείται ότι το Xist έχει εξελιχθεί από το ψευδογονίδιο που ήταν ενσωματωμένο στο γονίδιο Lnx3 (Elisaphenko et al, 2008).

1.3.4 Long intronic RNAs

Πρόσφατα, πολλά μεταγραφήματα έχουν αναφερθεί από μεγάλου εύρους μεταγραφές, να κωδικοποιούνται μέσα στα ιντρόνια γνωστών γονιδίων (Rearick et al, 2011). Πολλά από αυτά έχει παρατηρηθεί να έχουν διαφορετικά πρότυπα έκφρασης, ανταπόκριση σε ερεθίσματα και ανάμειξη στον καρκίνο αλλά μόνο μερικά από αυτά έχουν μελετηθεί λεπτομερώς μέχρι σήμερα (Guil et al, 2012).

1.3.5 Divergent transcripts, μεταγραφήματα σχετιζόμενα με υποκινητές και RNA ενισχυτές

Είναι σύντομα μεταγραφήματα που κυμαίνονται από 20-2500 nt και έχει βρεθεί ότι παράγονται από περιοχές έναρξης της μεταγραφής, σε sense και antisense κατευθύνσεις (He et al, 2008).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 : ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΙ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ LncRNAs

2.1 LncRNAs : Τι είναι, που είναι και γιατί είναι;

Το 2001, η κοινοπραξία της αλληλουχίας του ανθρώπινου γονιδιώματος, κυκλοφόρησε το τελικό σχέδιο για το ανθρώπινο γονιδίωμα (Lander et al, 2001). Σύμφωνα με τις μεθόδους αλληλούχισης και μικροσυστοιχίες πλακιδίων DNA εκτιμάται ότι το 70% του γονιδιώματος μεταγράφεται αλλά μόνο το 2% εξυπηρετεί ως πρότυπο για πρωτεΐνες (Bertone et al, 2004; Birney et al, 2007b; Carninci et al, 2005). Τα RNA μόρια που στερούνται κωδικοποίηση πρωτεϊνών, συλλογικά αναφέρονται ως μη κωδικοποιητικά RNA (ncRNAs) και τα γνωστά ncRNAs είναι τα κλασικά “housekeeping” RNAs, όπως τα tRNAs, rRNAs, τα μικρά πυρηνικά RNAs (snRNAs) και τα snoRNAs (small nucleolar RNAs), τα οποία εκφράζονται και παίζουν κρίσιμο ρόλο στην βιοσύνθεση πρωτεϊνών.

Σύμφωνα με το μέγεθός τους τα ncRNAs υποδιαιρούνται σε δύο ομάδες: τα μικρά ncRNAs (<200nt) και τα μακρά ncRNAs. Τα τελευταία χρόνια τα μικρά ncRNAs όπως τα miRNAs, siRNAs και piRNAs έλαβαν μεγαλύτερη προσοχή και ειδικά τα miRNAs, τα οποία έδειξαν ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στον καρκίνο (Calin & Croce, 2006; Trang et al, 2008; Winter et al, 2009). Ωστόσο έχει γίνει όλο και πιο σαφές ότι το γονιδίωμα των θηλαστικών κωδικοποιεί επίσης πολλά lncRNAs, που ορίζονται ως ενδογενή κυτταρικά RNA με περισσότερα από 200 νουκλεοτίδια σε μήκος που στερούνται ανοικτό πλαίσιο ανάγνωσης (ORF) σημαντικού μήκους (λιγότερο από 100 αμινοξέα) (Chen & Carmichael, 2010; Dinger et al, 2008; Lipovich et al, 2010; Ponting et al, 2009). Ως εκ τούτου, τα lncRNAs αποτελούν μία ετερογενή ομάδα μορίων RNA που τους επιτρέπει να καλύπτουν ένα ευρύ φάσμα μοριακών και κυτταρικών λειτουργιών με την εφαρμογή διαφορετικών τρόπων δράσης.

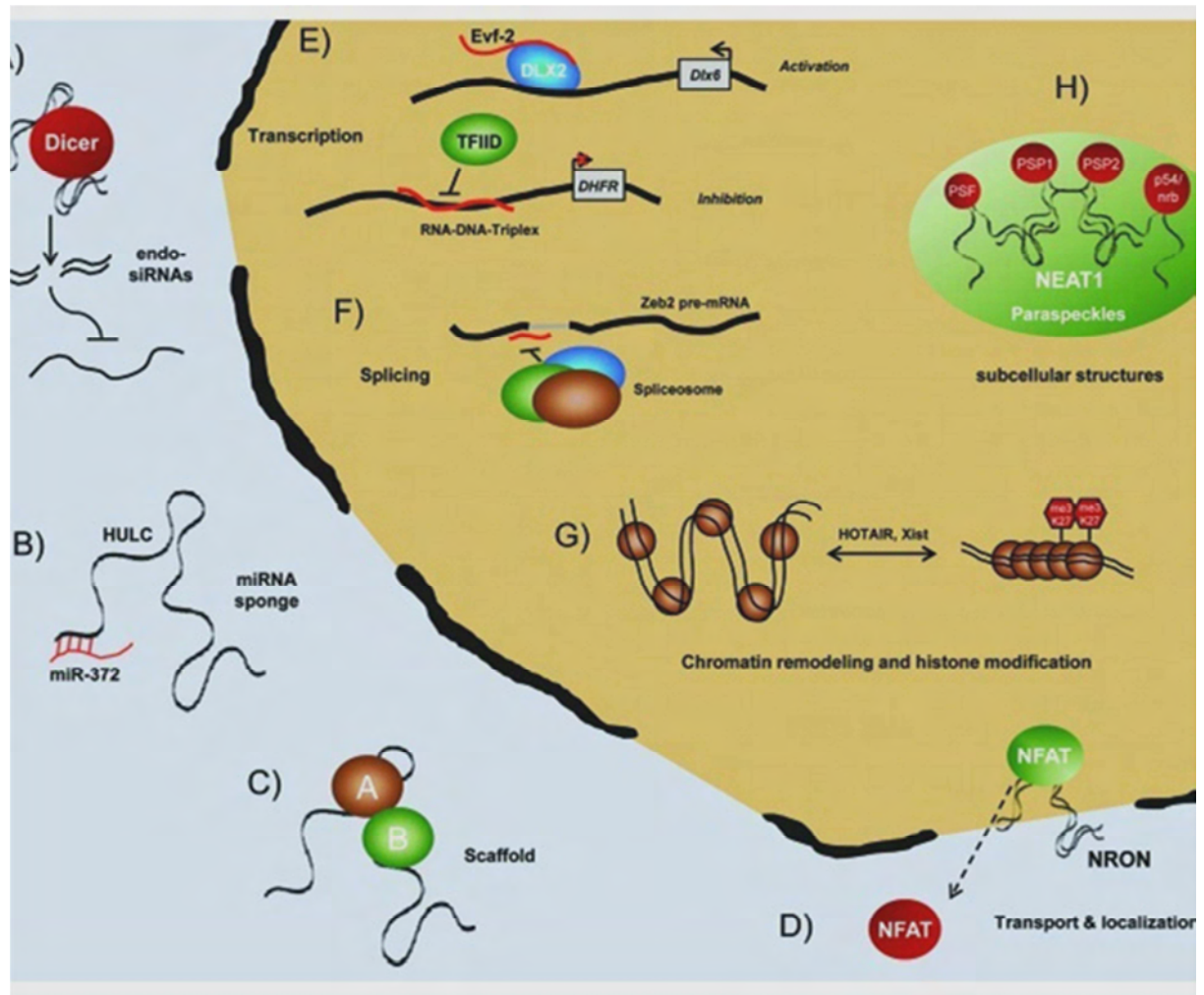
Αρχικά, τα lncRNAs ανακαλύφθηκαν μέσω μεγάλης κλίμακας αλληλούχιση (large-scale sequencing) πλήρους μήκους των cDNA βιβλιοθηκών στα ποντίκια (Okazaki et al, 2002b). Άλλες ονομασίες όπως largeRNA, macroRNA, long intergenic ncRNA (lincRNA) χρησιμοποιούνται για να αναφερθούν στα lncRNAs. Τα lncRNAs συχνά αλληλεπικαλύπτονται ή είναι διάσπαρτα ανάμεσα σε κωδικοποιητικά ή μη κωδικοποιητικά μεταγραφήματα (Carninci et al, 2005; Kapranov et al, 2005; Mercer et al, 2009). Από γενετικής άποψης, τα ncRNAs εμπίπτουν σε μία ή περισσότερες από πέντε μεγάλες κατηγορίες: (1) sense ή (2) antisense, όταν επικαλύπτουν ένα ή περισσότερα εξόνια άλλου μεταγραφήματος στον ίδιο ή στον αντίθετο κλώνο, αντίστοιχα, (3) διπλής κατεύθυνσης (bidirectional) όταν η έκφραση από αυτό και ένα γειτονικό κωδικοποιητικό μεταγράφημα στον αντίθετο κλώνο κινείται κοντά του γονιδιώματος, (4) intronic όταν προέρχεται από ένα εσώνιο ενός δεύτερου μεταγραφήματος (Calin et al, 2007), ή (5) intergenic όταν βρίσκεται ως ανεξάρτητη μονάδα στο εσωτερικό του γενωμικού διαστήματος μεταξύ δύο γονιδίων (Ponting et al, 2009).

Αρκετές μελέτες διεξήχθησαν για τον προσδιορισμό των lncRNAs στο ανθρώπινο γονιδίωμα (Gibb et al, 2011; Hutzinger et al, 2010; Khalil et al, 2009; Loewer et al, 2010; Peng et al, 2010; Prensner et al, 2011; Rinn et al, 2007b; Wang et al, 2011). Μία πρόσφατη μελέτη εντόπισε 5.446 lncRNA γονίδια στο ανθρώπινο γονιδίωμα και σε συνδυασμό με άλλες τέσσερις δημοσιογραφικές πηγές κατέληξαν στα 6.736 lncRNA γονίδια (Jia et al, 2010). Αυτές οι μελέτες εξέτασαν επίσης την ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεϊνών γνωστών γονιδίων που επικαλύπτονται με lncRNA και αποκάλυψε ότι το 62% των γνωστών γονιδίων με «υποθετική πρωτεΐνη» δεν είχαν την ικανότητα να κωδικοποιούν πρωτεΐνη και αυτό θα μπορούσε να διευρύνει ακόμη περισσότερο τον κατάλογο των ανθρώπινων lncRNAs.

Για την συντριπτική πλειοψηφία των lncRNAs που ανακαλύφθηκαν πρόσφατα, χρειάζεται να διευκρινιστεί η κυτταρική λειτουργία. Για κάθε επιμέρους μόριο πρέπει να καθοριστεί αν εκτελεί σημαντικές λειτουργίες ή αν αποτελεί απλώς «μεταγραφικό θόρυβο» ή μεταγραφικό παρασκήνιο. Μερικά lncRNAs δείχνουν

σαφή εξελικτική διατήρηση ή αυστηρή ρύθμιση, υπονοώντας ότι είναι λειτουργικής σημασίας (Chodroff et al, 2010; Guttman et al, 2009b; Huarte et al, 2010; Hutchinson et al, 2007). Επιπλέον, ορισμένα μεταγραφήματα προέρχονται από υπέρ-συντηρημένες περιοχές (UCR) του γονιδιώματος, τα οποία (T-UCRs) μπορεί να μετατραπούν σε ανθρώπινο καρκίνο (Bejerano et al, 2004; Calin et al, 2007).

Επίσης, τα lncRNAs εκφράζονται συχνά σε ασθένειες, σε ιστούς ή σε αναπτυξιακό στάδιο, με ειδικό τρόπο κάνοντας αυτά τα μόρια ελκυστικούς θεραπευτικούς στόχους και με κατεύθυνση σε συγκεκριμένες λειτουργίες για την ανάπτυξη και τις ασθένειες (Amaral et al, 2009; Fu et al, 2006; Ravasi et al, 2006). Ωστόσο, πρόσφατα έγινε γνωστό ότι τα lncRNAs διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης σε διάφορα επίπεδα, συμπεριλαμβανομένης της τροποποίησης της χρωματίνης, τη μεταγραφή και τη μεταγραφική επεξεργασία (Mercer et al, 2009; Wilusz et al, 2009). Για παράδειγμα, το lncRNA Xist (X inactive-specific transcript) ή το HOTAIR (HOX Antisense Intergenic RNA) αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης για την επαγωγή σχηματισμού ετεροχρωματίνης σε συγκεκριμένες γονιδιωματικές θέσεις, τα οποία οδηγούν σε μειωμένη έκφραση του γονιδίου στόχου (Gupta et al, 2010; Rinn et al, 2007b; Tsai et al, 2010; Zhao et al, 2010). Τα lncRNAs μπορούν επίσης να λειτουργήσουν με τη ρύθμιση της μεταγραφής μέσα από μία ποικιλία μηχανισμών που περιλαμβάνουν την αλληλεπίδραση με RNA πρωτεΐνες σύνδεσης, ενεργώντας ως συν-ενεργοποιητές των παραγόντων μεταγραφής ή καταστέλλοντας έναν σημαντικό υποκινητή των γονιδίων στόχων (Feng et al, 2006; Martianov et al, 2007; Wang et al, 2008). Εκτός από την τροποποίηση της χρωματίνης και τη μεταγραφική ρύθμιση, τα lncRNAs ρυθμίζουν και τη γονιδιακή έκφραση στο μετα-μεταγραφικό επίπεδο ή στο επίπεδο ματίσματος (Beltran et al, 2008; Faghihi et al, 2008; Tripathi et al, 2010). Στην εικόνα 2 παρέχεται μία γενική εικόνα για τις λειτουργίες των lncRNAs.



Εικόνα 2 Κυτταρικές λειτουργίες των lncRNAs. Τα lncRNAs μπορούν να ενεργούν στο κύτταρο με διαφορετικούς τρόπους. Μπορούν να ρυθμίζουν την έκφραση γονιδίων, να επηρεάσουν τον εντοπισμό της πρωτεΐνης (D) και επίσης είναι σημαντικά για τον σχηματισμό των κυτταρικών υποδομών ή των πρωτεϊνικών συμπλόκων, εφόσον πληρούνται οι λειτουργίες των ικριωμάτων (C, H) (Clemson et al, 2009). Η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης είναι μία από τις καλά μελετημένες λειτουργίες των lncRNAs και οι πολλαπλοί μηχανισμοί που εφαρμόζονται από αυτά. (A) Τα lncRNAs μπορούν να μεταποιηθούν σε μικρά, μονής ή διπλής έλικας, RNAs που θα μπορούσαν να δράσουν ως ενδο-siRNAs που στοχεύουν σε άλλα RNA, τα οποία στη συνέχεια οδηγούνται σε στοχευμένη αποικοδόμηση. (B) Τα lncRNAs μπορούν να δράσουν ως «σφουγγάρι miRNA» δεσμεύοντας miRNAs για να απενεργοποιήσουν αυτά τα μικρά ρυθμιστικά RNAs. Αυτό επηρεάζει την έκφραση των miRNA γονιδίων στόχων (Wang et al, 2010). (D) Αλληλεπίδραση των lncRNAs με πρωτεΐνες που μπορούν να ρυθμίζουν την δραστικότητα της πρωτεΐνης και τον εντοπισμό της. Για παράδειγμα, το lncRNA NRON (non-coding repressor of NFAT) δεσμεύεται με τον κυτταρικό μεταγραφικό παράγοντα NFAT (πυρηνικός παράγοντας των ενεργοποιημένων Τη κυττάρων). Αυτό ρυθμίζει την διακίνηση του NFAT από τον πυρήνα στο κυτταρόπλασμα και τελικά οδηγεί στην καταστολή έκφρασης του γονιδίου στόχου NFAT (Willingham et al, 2005). (E) Επιπλέον, τα lncRNAs ρυθμίζουν την μεταγραφή γονιδίων μέσω πρόσληψης μεταγραφικών

παραγόντων στους υποκινητές των γονιδίων στόχων, με αποτέλεσμα την ενεργοποίηση της γονιδιακής έκφρασης (Feng et al, 2006). Ωστόσο, μπορούν επίσης να εμποδίσουν την πρόσδεση των γενικών μεταγραφικών παραγόντων ενδεχομένως μέσω σχηματισμού RNA-DNA-Τριπλετών (Martianov et al, 2007). (F) Τα lncRNAs συμβάλλουν στην πολυπλοκότητα του μεταγραφήματος, δεδομένου ότι μπορούν να ρυθμίσουν το εναλλακτικό μάτισμα των pre-mRNAs (Beltran et al, 2008). (G) Η ισορροπία μεταξύ ενεργής μεταγραφικής ευχρωματίνης και σιωπηλής ετεροχρωματίνης, ελέγχεται από τα lncRNAs. Μπορούν να αλληλεπιδρούν με σύμπλοκα αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης και προκαλεί τοπικές ή καθολικές αλλαγές στη συσκευασία της χρωματίνης (Rinn et al, 2007b; Zhao et al, 2008).

2.1.1 Κοινά χαρακτηριστικά lncRNAs και mRNAs

Υψηλής απόδοσης αναλύσεις του γονιδιώματος σε ευκαρυωτικά κύτταρα έχουν αποκαλύψει διάχυτη μεταγραφή στους περισσότερους, αν όχι σε όλους, τους γονιδιωματικούς τόπους. Αυτό παράγει πολλά μη κωδικοποιούντα RNA (lncRNAs) τα οποία στερούνται την ικανότητα κωδικοποίησης πρωτεΐνης και είναι ευδιάκριτα από τα καλά χαρακτηρισμένα διαρθρωτικά RNAs (rRNAs, tRNAs, snRNAs, snoRNAs) ή από τα μικρά ρυθμιστικά RNAs. Τα lncRNAs προκύπτουν από διαγονιδιακές (intergenic), antisense ή περιοχές του υποκινητή. Υπάρχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά μεταξύ lncRNAs και mRNAs: και οι δύο κατηγορίες RNA διαθέτουν 5'-μεθυλγουανοσίνη κάλυμμα (Neil et al, 2009) και πολυ(A) ουρά (David et al, 2006) και έχουν σε μεγάλο βαθμό παρόμοια μήκη. Επιπλέον και τα δύο μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II (RNA pol II) από παρόμοια προεναρκτήρια σύμπλοκα (Rhee & Pugh, 2012) και μπορούν να ρυθμιστούν από κοινούς μεταγραφικούς παράγοντες. Παρά τις ομοιότητες, η τύχη και η λειτουργία των lncRNAs και mRNAs είναι διαφορετική. Τα περισσότερα mRNAs γρήγορα εξάγονται στο κυτταρόπλασμα, όπου εμπλέκονται στον μηχανισμό της πρωτεϊνοσύνθεσης. Σε αντίθεση, στα lncRNAs έχουν αποδοθεί ποικίλες πυρηνικές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της συναρμολόγησης των πυρηνικών περιοχών, κατεύθυνσης της τροποποίησης της χρωματίνης, επαναφορά των επιγενετικών σημάτων και ρύθμιση της μεταγραφής του mRNA.

2.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ : ΤΥΠΟΣ Ι: ΣΗΜΑΤΑ

Η πλειοψηφία των lncRNAs μεταγράφονται από την RNA πολυμεράση II, όπως αποδεικνύεται από την πληρότητα της Pol II, διαθέτουν 5'-μεθυλγουανουσίνη κάλυμμα (5' caps), συμμετέχουν στις τροποποιήσεις των ιστονών που συνδέονται με την Pol II μεταγραφική επιμήκυνση και στην πολυαδενυλίωση (Guttman et al, 2009b). Τα lncRNAs έχουν κυτταροειδική έκφραση και ανταποκρίνονται σε διαφορετικά ερεθίσματα, γεγονός που υποδηλώνει ότι η έκφρασή τους γίνεται κάτω από μεγάλο μεταγραφικό έλεγχο. Ως εκ τούτου, τα lncRNAs μπορεί να χρησιμεύουν ως μοριακά σήματα, διότι η μεταγραφή μεμονωμένων lncRNAs συμβαίνει σε ένα πολύ συγκεκριμένο χρόνο και είναι μέρος για να ενσωματωθούν τα αναπτυξιακά συνθήματα, ερμηνεύοντας το κυτταρικό περιβάλλον ή ανταποκρίνονται σε ποικίλα ερεθίσματα. Μερικά lncRNAs σε αυτό το αρχέτυπο διαθέτουν ρυθμιστικές λειτουργίες, ενώ άλλα είναι απλώς υποπροϊόντα μεταγραφής – είναι η πράξη της έναρξης, επιμήκυνσης ή τερματισμού που είναι το κανονικό. Σε κάθε περίπτωση, μπορεί κανείς εύκολα να συμπεράνει την κατάσταση της χρωματίνης των ρυθμιστικών στοιχείων απλώς με την έκφραση των συνδεδεμένων τους lncRNAs. Επιπλέον, το πλεονέκτημα από την χρήση RNA ως μέσο υποδεικνύει ότι οι δυναμικές ρυθμιστικές λειτουργίες μπορούν να εκτελεστούν γρήγορα χωρίς την πρωτεϊνική μετάφραση. Τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως σήματα για τη σήμανση του χώρου, του χρόνου, στο αναπτυξιακό στάδιο και στην έκφραση για τη ρύθμιση των γονιδίων. Ειδικότερα, μπορεί να δρουν ως δείκτες των λειτουργικά σημαντικών βιολογικών συμβάντων.

2.2.1 ΕΙΔΙΚΟΤΗΤΑ ΑΛΛΗΛΟΜΟΡΦΩΝ

Αποτύπωση είναι ένας επιγενετικός ρυθμιστικός μηχανισμός που απεικονίζει την έννοια της ιδιαιτερότητας του αλληλίου. Τα θηλαστικά είναι διπλοειδείς οργανισμοί που φέρουν δύο αλληλόμορφα σε κάθε αυτοσωματικό γονίδιο, ένα κληρονομούμενο από τη μητέρα και ένα από τον πατέρα. Βέβαια στις περισσότερες περιπτώσεις και τα δύο αλληλόμορφα γονικής προέλευσης εκφράζονται εξίσου. Ένα υποσύνολο γονιδίων δείχνουν αποτύπωση, όπου η έκφραση περιορίζεται από έναν επιγενετικό μηχανισμό είτε στο πατρικό είτε στο μητρικό αλληλόμορφο.

Πρόσφατα αναδυόμενα στοιχεία δείχνουν ότι lncRNAs όπως τα Kcnq1ot1 και Air, τα οποία τοποθετούνται στο χάρτη των Kcnq1 και Igf2r, αποτυπώνουν συστάδες γονιδίων και διαμεσολαβούν στην μεταγραφική αποσιώπηση πολλαπλών γονιδίων μέσω αλληλεπίδρασης με τη χρωματίνη και στρατολόγησης του μηχανισμού τροποποίησης της χρωματίνης. Για παράδειγμα, στον πλακούντα ποντικού, lncRNAs όπως τα Kcnq1ot1 και Air συσσωρεύονται στους υποκινητές της χρωματίνης σε αποσιωπημένα αλληλόμορφα και μεσολαβούν κατασταλτικές τροποποιήσεις των ιστονών με έναν αλληλόμορφο-ειδικό τρόπο (Mohammad et al, 2009). Το Kcnq1 είναι ένα lncRNA μεγέθους 90 kb που εκφράζεται από το πατρικό αλληλόμορφο και κατευθύνει την αποσιώπηση ενός συνόλου γονιδίων στην περιοχή αποτύπωσης Kcnq1 (Pandey et al, 2008). Το Kcnq1ot1 αλληλεπιδρά με τις μεθυλοτρανσφεράσες ιστονών G9a και PRC2, σχηματίζοντας αποτελεσματικά μία περιοχή καταστολής in cis στον χώρο της μεταγραφής μέσω πρόσληψης συμπλόκων – το ίδιο το RNA φαίνεται να παίζει σημαντικό ρόλο στην αμφίδρομη αποσιώπηση γονιδίων στην περιοχή Kcnq1, θυμίζοντας τους μηχανισμούς δράσης του Xist RNA.

Ομοίως, το ncRNA Air εκφράζεται και αποτυπώνεται μόνο από το πατρικό αλληλόμορφο και η μεταγραφή του απαιτείται για την καταστολή αρκετών αποτυπωμένων γονιδίων του πατρικού χρωμοσώματος με ιστοειδικό τρόπο. Στον πλακούντα, που η πρόσληψη δραστηριοτήτων τροποποίησης της χρωματίνης του Kcnq1ot1 είναι παρόμοια, η μονάδα μεταγραφής του Air κινεί το

δεύτερο εσώνιο του γονιδίου Igf2r στο ποντίκι και στρατολογεί το G9a στον υποκινητή στόχο για να επέλθει η αποσιώπηση γονιδίων (Nagano et al, 2008). Ωστόσο, σε εμβρυϊκούς ιστούς, το Air ασκεί τις δράσεις του μέσω ενός διαφορετικού μηχανισμού όπου το δικό του μεταγράφημα παίζει κρίσιμο ρόλο στην αποσιώπηση του γονιδίου που επικαλύπτεται (Stoger et al, 1993).

Η αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος (XCI) είναι μία στενά συνδεδεμένη διαδικασία που εξισορροπεί τη γονιδιακή έκφραση μεταξύ αρσενικών και θηλυκών θηλαστικών με την αδρανοποίηση ενός από τα δύο X στα κύτταρα των θηλυκών θηλαστικών. Το Xist είναι ένα πολύ γνωστό lncRNA το οποίο διαδραματίζει έναν πολύ σημαντικό ρόλο στην XCI (Pontier & Gribnau, 2011). Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του θηλυκού, το Xist RNA εκφράζεται από το ανενεργό X και «καλύπτει» το χρωμόσωμα X από το οποίο έχει μεταγραφεί, οδηγώντας στην καταστολή της γονιδιακής έκφρασης ολόκληρου του χρωμοσώματος. Η επικάλυψη ενός antisense lncRNA, το οποίο ονομάζεται Tsix, καταστέλλει την έκφραση του Xist in cis, ενώ το lncRNA Jpx, του οποίου η έκφραση δημιουργείται κατά την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος, ενεργοποιεί το Xist στο ανενεργό X (Tian et al, 2010).

Και στα τρία παραδείγματα, η παρουσία των μεταγραφημάτων των lncRNA υποδεικνύει ενεργό αποσιώπηση στις αντίστοιχες γονιδιακές θέσεις εντοπισμού τους.

2.2.2 ΑΝΑΤΟΜΙΚΗ ΕΙΔΙΚΗ ΕΚΦΡΑΣΗ

Ένα άλλο παράδειγμα της στενής σχέσης μεταξύ του χώρου και του χρόνου απεικονίζεται από δύο ncRNAs από τον τόπο Hox των θηλαστικών. Στα θηλαστικά οι παράγοντες μεταγραφής ομοιοακολουθίας (HOX) οργανώνονται σε τέσσερις χρωμοσωμικές ομάδες και εκφράζονται σε μία τμηματική σειρά που είναι σε μία συγγραμική θέση μεταξύ των γονιδίων μέσα στο σύμπλεγμα και σε χωροταξική θέση κατά μήκος του πρόσθιου και οπίσθιου ανατομικού άξονα του σώματος (Wang et al, 2009). Πολυάριθμα lncRNAs βρέθηκαν να μεταγράφονται

από το εσωτερικό των ανθρώπινων συμπλεγμάτων HOX(Rinn et al, 2007b) που εκφράστηκαν με έναν χρονο και τοπο-ειδικό τρόπο. Τα lncRNAs βρέθηκαν να είναι συγγραμικά με το συνολικό ανατομικό πρότυπο έκφρασης των τόπων HOX, που σημαίνει ότι πιθανόν να χρησιμοποιούσαν τους ίδιους ενισχυτές με τα γονίδια HOX. Για παράδειγμα, το HOTAIR, ένα lncRNA του τόπου HOXC το οποίο εκφράζεται σε απομακρυσμένες και οπίσθιες θέσεις ταυτότητας, και το Frigidair, ένα άλλο HOXC lncRNA, το οποίο έχει πρόσθιο πρότυπο έκφρασης. Σε αντίθεση, το HOTTIP, ένα άλλο lncRNA το οποίο βρίσκεται σε απομακρυσμένο άκρο του HOXA συμπλέγματος, εκφράζεται επίσης σε περιφερικά κύτταρα. Επιπροσθέτως, χρησιμεύουν ως σήματα ανατομικής θέσης, έχοντας και τα δύο lncRNAs επιπλέον βιολογικές λειτουργίες, όπως προαναφέρθηκε.

2.2.3 ΕΠΑΓΩΓΗ ΑΠΟ ΒΛΑΒΗ DNA

Τα lncRNAs που δρουν για την ενσωμάτωση περιβαλλοντολογικών περιστάσεων μπορεί να βρεθούν όχι μόνο κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης αλλά και κατά τη διάρκεια οργανικού στρες. Στην δημοσίευσή του ο (Huarte et al, 2010) έδειξε ότι τα lncRNAs διαδραματίζουν ένα ρυθμιστικό ρόλο κλειδί στη μεταγραφική απάντηση του p53. Ένας από τους άμεσους στόχους του p53 στην απάντηση σε βλάβη του DNA, είναι ένα lncRNA που ονομάζεται lincRNA-p21 και βρίσκεται ανοδικά του CDKN1A γονιδίου, βρέθηκε να δρα ως μεταγραφικός καταστολέας στο κανονικό μονοπάτι του p53 και να παίζει ρόλο στην ενεργοποίηση της απόπτωσης. Το p53 ρυθμίζει το lincRNA-p21 με την άμεση πρόκληση της έκφρασής του, πιθανόν μέσω της άμεσης σύνδεσής του με τον υποκινητή του lincRNA-p21, καθώς η μείωση των μεγάλων διαγονιδιακών ncRNA (lincRNA)-p21 αυξάνει την έκφραση των πολυάριθμων p53-κατεσταλμένων μεταγραφημάτων. Επιπλέον, το lincRNA-p21 καταστέλλεται από τα p53-ρυθμιστικά γονίδια μέσω της σύνδεσής του και διαφοροποίησης του εντοπισμού της ετερογενούς πυρηνικής ριβονουκλεοπρωτεΐνης K (hnRNP-K) (Huarte et al, 2010).

Ένα άλλο παράδειγμα της ρύθμισης της δραστηριότητας των γονιδίων σε απάντηση προς τα εξωτερικά ερεθίσματα βρίσκεται πάλι στον υποκινητή του CDKN1A, όπου μεταγράφονται πολλά lncRNA μετά από βλάβη του DNA (Hung et al, 2011). Ένα τέτοιο lncRNA, το οποίο ονομάζεται PANTA, επάγεται επίσης με p53-εξαρτώμενο τρόπο. Το PANTA δεν μπορεί να ενεργοποιηθεί σε βλάβη του DNA με απουσία του p53. Μετά τη βλάβη του DNA, το p53 προσδένεται άμεσα στο CDKN1A και ενεργοποιεί το PANTA, το οποίο στη συνέχεια αλληλεπιδρά με τον μεταγραφικό παράγοντα NF- κ B για να περιορίσει την έκφραση προαποπτωτικών και ενεργοποιεί την διακοπή του κυτταρικού κύκλου, γεγονός που υποδηλώνει δυνητικά διαδεδομένους ρόλους των lncRNAs στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης.

2.2.4 ΠΟΛΥΔΥΝΑΜΙΚΟΤΗΤΑ ΚΑΙ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ

lncRNAs που σχετίζονται με την πολυδυναμικότητα αρχικά ανακαλύφθηκαν στα εμβρυϊκά βλαστικά κύτταρα ποντικού (ESCs) (Guttman et al, 2009b). Ο Loewer και οι συνεργάτες του δείχνουν ότι ο επαναπρογραμματισμός των σωματικών κυττάρων προκαλείται από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSCs) και συνοδεύεται από εμπλουτισμένη έκφραση lincRNAs (Loewer et al, 2010). Ένα από αυτά τα lincRNAs που επάγουν τον επαναπρογραμματισμό, είναι το lincRNA-RoR, το οποίο φαίνεται να στοχοποιείται άμεσα από τους βασικούς πολυδύναμους παράγοντες Oct4, Sox2 και Nanog μέσω της εντόπισης και των τριών παραγόντων κοντά στην περιοχή του υποκινητή (Loewer et al, 2010). Το RoR υποεκφράζεται κατά τη μείωση του Oct4 καθώς και κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης των iPSCs.

2.2.5 ΣΥΝΤΟΝΙΣΜΕΝΗ ΔΡΑΣΗ ΑΠΟ ΤΑ eRNAs (enhancer RNAs)

Είναι γνωστό ότι οι ρυθμιστικές πρωτεΐνες ασκούν τις λειτουργίες τους με την πρόσδεσή τους σε τμήματα του μη κωδικοποιητικού DNA, είτε κοντά στην θέση έναρξης μεταγραφής στον υποκινητή ενός mRNA μετάγραφου ενός γονιδίου ή πιο μακριά στο γονιδίωμα στον ενισχυτή. Οι ενισχυτές με την σειρά τους δρουν βοηθώντας να προσδεθεί η RNA πολυμεράση με τον υποκινητή. Έχει περιγραφεί μία νέα κατηγορία ncRNAs, τα eRNAs (enhancer RNAs), για τα οποία περιγράφηκε ότι παράγονται με δραστικότητα εξαρτώμενη από την RNA pol II που συνδέεται σε ειδικούς ενισχυτές (Kim et al, 2010). Το επίπεδο έκφρασης των eRNAs σε αυτούς τους ενισχυτές σχετίζεται θετικά με το επίπεδο σύνθεσης των mRNAs σε κοντινά γονίδια, γεγονός που υποδηλώνει ότι η σύνθεση του eRNA λαμβάνει χώρα ειδικά σε ενισχυτές που συμμετέχουν ενεργά στην προώθηση της σύνθεσης του mRNA (Carey & Wang, 2011; Kim et al, 2010). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι οι ενισχυτές έχουν ένα πιο ενεργό ρόλο, σχετιζόμενο με τους υποκινητές, στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης.

Πλησιάζοντας το ζήτημα από διαφορετική οπτική γωνία, μια άλλη ομάδα εντόπισε μία νέα κατηγορία lncRNAs, τα οποία λειτουργούν όπως οι ενισχυτές, σε διαφορετικές ανθρώπινες κυτταρικές σειρές (Orom et al, 2010). Η μείωση αυτών των lncRNAs οδήγησε σε μειωμένη έκφραση των γειτονικών γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες, περιλαμβανομένων αρκετών κύριων ρυθμιστών της κυτταρικής διαφοροποίησης. Όπως οι κλασικοί ενισχυτές, έτσι και αυτά τα lncRNAs, έχουν ανεξάρτητο προσανατολισμό και απαιτούν έναν ελάχιστο υποκινητή στα γονίδια στόχους τους για να ενισχύσουν την μεταγραφή τους. Αυτή η ομάδα των lncRNAs δείχνει ότι η μεταγραφή στα ευκαρυωτικά κύτταρα είναι πολύ στενά συνδεδεμένη με τους μηχανισμούς επικάλυψης. Και τα δύο παραπάνω παραδείγματα αποδεικνύουν ότι τα RNAs μπορούν να χρησιμεύσουν ως δείκτες των ενεργών ρυθμιστικών μονοπατιών.

2.2.6 ΑΝΙΧΝΕΥΤΗΣ ΕΠΑΝΑΛΗΨΗΣ

Ακόμη μία απρόβλεπτη λειτουργία των lncRNAs αποκαλύφθηκε όταν μία ομάδα εντόπισε αρκετά lncRNAs που είναι σημαντικά στην ρύθμιση των καθοδικών (downstream) υποσυνόλων του Staufen 1 (STAU1) – μεσολαβητικό αγγελιοφόρο RNA στην αποσύνθεση (SMD) (Gong & Maquat, 2011). Το SMD ρυθμίζει ποικίλες τάξεις των mRNAs σε κύτταρα των θηλαστικών που έχουν STAU1 θέσεις πρόσδεσης στην 3' αμετάφραστη περιοχή (3' UTR). Θεωρήθηκε ότι η θέση πρόσδεσης STAU1 είναι ένα στοιχείο *in cis* με συγκεκριμένες δευτερεύουσες δομές στο πλαίσιο της 3' UTR των SMD στόχων. Ενδιαφέρον δείχνει μία ομάδα κυτταροπλασματικών lncRNAs, που ονομάζεται half-STAU1-binding site RNAs (1/2-sbsRNAs), τα οποία φαίνεται να διευκολύνουν τον σχηματισμό θέσεων πρόσδεσης STAU1. Αυτό επιτεύχθηκε με ατελές ζευγάρισμα βάσεων, βασισμένο σε Alu επαναλήψεις, μεταξύ του lncRNA και της 3' UTR ορισμένων mRNAs, που προκύπτουν από την αποικοδόμηση των mRNAs μέσω SMD (Gong & Maquat, 2011). Τα μέλη αυτής της λειτουργικής κατηγορίας των lncRNAs μπορούν να ρυθμίζουν ένα καθοδικό υποσύνολο των SMD στόχων και ξεχωριστά lncRNAs μπορούν να ρυθμίζουν προς τα κάτω τον ίδιο SMD στόχο. Αυτά τα ευρήματα αποκαλύπτουν ένα νέο ρόλο των lncRNAs στον μεταβολισμό των mRNAs, ειδικά ως μηχανισμό ειδικό χωροταξικής και χρονικής πρόσληψης πρωτεϊνών για να μεσολαβήσει η αποσύνθεση του mRNA. Η ιδέα κατά την οποία μερικώς συμπληρωματικά διμερή lncRNA/mRNA μπορούν να σχηματίσουν σημεία πρόσδεσης Staufen, είναι πιθανό να ισχύει και για τη ρύθμιση άλλων δίκλωνων RNA – δεσμευτικών πρωτεϊνών (RBP) – εξαρτώμενων πρωτεϊνών.

Έτσι, το αρχέτυπο του σήματος των lncRNAs περιλαμβάνει όχι μόνο δείκτες των καθοδικών μεταγραφικών στοιχείων, αλλά και ανιχνευτές της αφθονίας των αντιγράφων/επανάληψης. Στο σύνολό τους, στο πρώτο αρχέτυπο των lncRNAs όλα λειτουργούν ως δείκτες της μεταγραφικής δραστηριότητας, ανεξάρτητα πρόσθετους λειτουργικούς ρόλους, με μία εκπληκτική μία προς μία σχέση.

2.3 ΤΥΠΟΣ II: ΠΑΓΙΔΕΣ

Η διάχυτη μεταγραφή των ενισχυτών και υποκινητών (Guenther et al, 2007), παραπέμπει τα lncRNAs σε έναν κεντρικό ρόλο ρυθμίζοντας τη μεταγραφή, και θετικά και αρνητικά. Τα μέσα με τα οποία αυτά τα εν λόγω ncRNAs ρυθμίζουν τη μεταγραφή επεκτείνονται σε μία ποικιλία μηχανισμών, με μία σημαντική η οποία λειτουργεί σαν μοριακή παγίδα. Αυτό το αρχέτυπο των lncRNAs μεταγράφεται και στη συνέχεια προσδένει και τιτλοδοτεί μακριά μια πρωτεΐνη στόχο, αλλά δεν ασκεί καμία επιπλέον λειτουργία. Τα RNA δρουν ως «μοριακός νεροχύτης» για τα RBPs, τα οποία είναι μεταγραφικοί παράγοντες, τροποποιητές της χρωματίνης ή άλλοι ρυθμιστικοί παράγοντες.

Τα lncRNAs που ταιριάζουν στη λειτουργία αυτού του αρχέτυπου πιθανότατα θα δρουν από την αρνητική ρύθμιση ενός τελεστή. Έτσι, η λογική λειτουργία είναι ένα RNA να αναστέλλει τον τελεστή X από την εκτέλεση της λειτουργίας του. Η κατεδάφιση του lncRNA θα πρέπει να μιμείται το κέρδος της λειτουργίας την πρωτεΐνης συνεργάτη, και η απώλεια της λειτουργίας τόσο του lncRNA όσο και του τελεστή θα οδηγήσει σε φαινότυπο διάσωσης.

2.3.1 DHFR (human dihydrofolate reductase)

Εναλλακτικοί υποκινητές μέσα στο ίδιο το γονίδιο είναι ένα γενικό φαινόμενο στη γονιδιακή έκφραση (Ayoubi & Van De Ven, 1996). Οι μηχανισμοί της επιλεκτικής τους ρύθμισης ποικίλουν από γονίδιο σε γονίδιο. Το γονίδιο της ανθρώπινης διϋδροφυλλικής αναγωγάσης (DHFR) είναι ένα τέτοιος τύπος που φαίνεται να διαθέτει έναν RNA μηχανισμό που εξαρτάται από την καταστολή της μεταγραφής (Martianov et al, 2007). Το lncRNA ξεκινάει ανοδικά από τον ελάχιστων υποκινητή του γονιδίου DHFR αναστέλλοντας τη συγκρότηση του προεναρκτήριου συμπλόκου στην περιοχή του μείζονος υποκινητή σχηματίζοντας ένα σταθερό σύμπλοκο ncRNA-DNA με αλληλουχίες υποκινητών, καθώς και μέσω άμεσων αλληλεπιδράσεων με το γενικό μεταγραφικό παράγοντα IIB (TFIIB). Όταν το lncRNA αποικοδομήθηκε από την καταστροφή του siRNA, η πληρότητα του

TFIIB στον μείζον υποκινητή, παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (Martianov et al, 2007). Αυτή είναι μία υψηλά δυναμική διαδικασία που παρουσιάζει έναν ειδικό μηχανισμό η οποία μπορεί να συμβάλλει στην στόχευση και καταστολή του υποκινητή και τονίζει τη σημασία των διαγονιδιακών ncRNA στην ρύθμιση της έκφρασης των γειτονικών γονιδίων, ενεργώντας ως δόλωμα.

2.3.2 TERRA: ΤΕΛΟΜΕΡΗ

Τα τελομερή είναι σύμπλοκα DNA-πρωτεΐνης που βρίσκονται στα φυσικά άκρα των ευκαρυωτικών χρωμοσωμάτων, τα οποία είναι απαραίτητα για τη σταθερότητα του χρωμοσώματος και έχουν βρεθεί να μεταγράφονται σε τελομερικά που περιέχουν επαναλαμβανόμενο RNA (TERRA), ένα lncRNA το οποίο αποτελεί ένα αναπόσπαστο τμήμα της τελομερικής ετεροχρωματίνης (Azzalin et al, 2007). Έχει υποτεθεί ότι η ύπαρξη του TERRA RNA παραπέμπει σε ένα νέο επίπεδο ρύθμισης και προστασίας των χρωμοσωμικών άκρων – και μπορούμε να πούμε ότι αυτή η υπόθεση ισχύει από την στιγμή που έχει αποδειχθεί ότι τα TERRA αλληλεπιδρούν φυσικά με την τελομεράση μέσω μίας επαναλαμβανόμενης αλληλουχίας συμπληρωματικής με την αλληλουχία του εκμαγείου της RNA τελομεράσης (Redon et al, 2010). Επιπλέον, τα TERRA συνδέουν μία υπομονάδα πρωτεΐνης, την τελομερική αντίστροφη μεταγραφάση (TERT), ανεξάρτητα από την πρότυπη χαρακτηριστική ομάδα της τελομεράσης. Αξίζει να σημειωθεί ότι, η τελομερική ετεροχρωματίνη – TERRA πιστεύεται ότι δεσμεύει και απομονώνει την τελομεράση, σε ένα σενάριο όπου τα TERRA διατηρούν την τελομεράση κοντά στο τελομερικό 3' άκρο ενώ αναστέλλει τη δράση της (Redon et al, 2010). Επιπρόσθετα, τα επίπεδα TERRA αλλάζουν στον κυτταρικό κύκλο με ένα τρόπο εξαρτώμενο, συσσωρεύοντάς τα στην αρχή της φάσης G1, στη συνέχεια μειώνονται στη φάση S, φτάνοντας στο χαμηλότερο επίπεδο έκφρασής τους κατά τη μετάβασή τους από το τέλος της S στην G2 φάση (Porro et al, 2010). Τα μειωμένα επίπεδα TERRA στη φάση S απελευθερώνουν ποσότητες τελομεράσης και επιτρέπουν την επέκταση του τελομερικού σκέλους με έναν τρόπο εξαρτώμενο από τον κυτταρικό κύκλο.

Επομένως, η ρύθμιση της τελομεράσης από το υπόστρωμα των τελομερών μπορεί να μεσολαβεί μέσω της μεταγραφής της. Αυτό ήταν ένα παράδειγμα ενός φυσικού RNA συνδέτη που ενεργεί ως άμεσος ρυθμιστής της ενζυματικής δραστηριότητας, χωρίς να είναι ένα υπόστρωμα.

2.3.3 MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1)

Ένα από τα πυρηνικά lncRNA σε αφθονία στα κύτταρα των θηλαστικών είναι το MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1). Το MALAT1 προσδένεται και ρυθμίζει αρκετούς παράγοντες ματίσματος σερίνης/αργινίνης (SR) στα πυρηνικά στίγματα. Η μείωση του MALAT1 μεταβάλλει τον εντοπισμό και δραστηριότητα των παραγόντων ματίσματος, οδηγώντας σε μεταβολή της διεξαγωγής του εναλλακτικού ματίσματος για ένα σύνολο pre-mRNAs (Tripathi et al, 2010). Στους νευρώνες του ιππόκαμπου, η ρύθμιση του MALAT1 στους παράγοντες ματίσματος SR είναι σημαντική για το σχηματισμό συνάψεων (Bernard et al, 2010). Έτσι, τα lncRNA «δολώματα» μπορούν να λειτουργήσουν σαν πυρηνικές υποπεριοχές καθώς και στην χρωματίνη και στο κυτταρόπλασμα. Συνοψίζοντας, αυτά τα παραδείγματα δείχνουν ότι τα lncRNA «δολώματα» μπορούν να τιτλοποιήσουν μακριά πρωτεΐνες και μικρά ρυθμιστικά RNA και πιθανότατα να λειτουργούν σε πολλά βασίλεια της ζωής.

2.3.4 PANDA (P21 associated ncRNA DNA damage activated)

Το lncRNA PANDA, ένα p53 – εξαρτώμενο μετάγραφο, φαίνεται και αυτό να έχει λειτουργία «δολώματος». Η βλάβη του DNA μπορεί να οδηγήσει σε απόπτωση ή σε διακοπή του κυτταρικού κύκλου. Το PANDA είναι πολύ ευαίσθητο σε βλάβη του DNA και η έκφρασή του επάγεται προσωρινά μπροστά από εκείνη του CDKN1A. Το PANDA αναστέλλει την έκφραση αποπτωτικών γονιδίων και ευνοούν την διακοπή του κυτταρικού κύκλου, μέσω της άμεσης πρόσδεσης και «παγίδευσής» του στον NF-YA, έναν πυρηνικό μεταγραφικό παράγοντα που

ενεργοποιεί το αποπτωτικό πρόγραμμα μετά την καταστροφή του DNA (Hung et al, 2011), με αποτέλεσμα την προώθηση της κυτταρικής επιβίωσης (στα πλαίσια χαμηλού επιπέδου βλάβης του DNA) μέσω της καταστολής έκφρασης των αποπτωτικών γονιδίων. Ο βαθμός εξάντλησης του PANDA αυξάνεται σημαντικά από την ποσότητα του παράγοντα NF-ΥΑ στα γονίδια στόχους, ενώ ταυτόχρονη εξουδετέρωση του NF-ΥΑ και ουσιαστική εξασθένηση του PANDA επάγουν τα αποπτωτικά γονίδια και την απόπτωση. Είναι ενδιαφέρον ότι ένα υποσύνολο των ανθρώπινων καρκίνων του μαστού, υπερεκφράζουν το PANDA, και η εξάντληση του PANDA μπορεί να ευαισθητοποιήσει τα κύτταρα σε χημειοθεραπευτικούς παράγοντες.

2.3.5 Gas5: ΥΠΟΔΟΧΕΑΣ ΓΛΥΚΟΚΟΡΤΙΚΟΕΙΔΩΝ

Το lncRNA Gas5 (growth arrest-specific 5) έχει πιστοποιηθεί σαν ένας νέος μηχανισμός με τον οποίο τα κύτταρα μπορούν να δημιουργήσουν μια κατάσταση σχετικής αντίστασης στα γλυκοκορτικοειδή (Kino et al, 2010). Το Gas5 καταστέλλει τον υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών μέσω του σχηματισμού ενός RNA μοτίβου από μία από τις βλαστικές δομές της αγκύλης του, που μιμείται το DNA μοτίβο ισοδύναμα με εκείνα τα στοιχεία ορμονικής απόκρισης τα οποία βρίσκονται στις περιοχές του υποκινητή των γλυκοκορτικοειδών γονιδίων. Τότε, το Gas5 συναγωνίζεται για πρόσδεση στην DNA περιοχή πρόσδεσης του υποδοχέα των γλυκοκορτικοειδών, που ενεργεί ως μοριακό «δόλωμα», και αποκλείει αποτελεσματικά την αλληλεπίδρασή του με το χρωμόσωμα (Kino et al, 2010). Αυτό μπορεί να αποδειχθεί ένα αναπόσπαστο συστατικό των ρυθμιστικών μηχανισμών για τη διαμόρφωση της δραστηριότητας των στεροειδών ορμονών στον ιστό στόχο.

2.4 ΤΥΠΟΣ ΙΙΙ: ΟΔΗΓΟΙ

Το τρίτο αρχέτυπο των lncRNAs είναι οι οδηγοί, όπου το RNA προσδένεται στην πρωτεΐνη-εξ και έπειτα κατευθύνει την εντόπιση του συμπλόκου της ριβονουκλεοπρωτεΐνης σε συγκεκριμένους στόχους. Όπως είναι προφανές από αυτά που έχουν ειπωθεί έως τώρα, τα lncRNAs μπορούν να καθοδηγήσουν τις αλλαγές στη γονιδιακή έκφραση, είτε *in cis* (σε γειτονικά γονίδια) είτε *in trans* (γονίδια σε μακρινή τοποθεσία) κατά τέτοιο τρόπο που δεν είναι εύκολο να προβλεφθεί βάσει της αλληλουχίας των lncRNAs. Οι μυριάδες διακριτικοί και πιθανόν διαδεδομένοι ρόλοι αυτών των RNA στη μεταγραφική ρύθμιση υπαγορεύει την ανάγκη ότι ορισμένες τοπικές αλλαγές στη δομή της χρωματίνης μπορεί να μην έχουν μόνο τοπικές επιπτώσεις, αλλά και διαρθρωτικές επιπτώσεις σε μια απόσταση. Πράγματι, τα lncRNAs όπως το Air και eRNA φαίνεται να ασκούν τις επιδράσεις τους *in cis* με την εξάπλωση των στοιχείων του μεταγραφικού ελέγχου από την κεντρική αλληλουχία, όπως οι υποκινητές ή ενισχυτές. Αντίθετα, τα lncRNAs HOTAIR και lincRNA-p21, οι μεγάλης εμβέλειας δράσεις τους στη γονιδιακή ρύθμιση απαιτούν πρόσθετη ικανότητα των συστατικών των αλληλεπιδρώντων συνεργατών για να είναι σωστά τοποθετημένα στους χώρους δράσης τους. Κατ' αρχήν τα lncRNAs μπορούν να καθοδηγήσουν την αλλαγή της χρωματίνης *in cis* με έναν συνμεταγραφικό τρόπο (προσδεδεμένα από την RNA πολυμεράση) ή ως συμπληρωματικός στόχος για τα μικρά ρυθμιστικά RNA. Η καθοδήγηση *in trans* μπορεί να συμβεί προσδένοντας το lncRNA στον DNA στόχο ως RNA (Hung & Chang, 2010).

Τα ρυθμιστικά στοιχεία των γονιδίων που προήλθαν από τα lncRNAs περιλαμβάνουν τόσο κατασταλτικά όσο και ενεργοποιητικά σύμπλοκα, καθώς και οι μεταγραφικοί παράγοντες (TFIIB). Ωστόσο, χωρίς να έχει σημασία η απόσταση ή ο μηχανισμός (*cis* ή *trans*), η αρχή παραμένει η ίδια: η μεταφορά των ρυθμιστικών πληροφοριών μέσω μίας παρεμβατικής έκτασης του DNA για τον έλεγχο έκφρασης του γονιδίου-στόχου, φέρνοντας αλλαγές στο επιγονιδίωμα. Υπάρχει περαιτέρω πολυπλοκότητα στο αρχέτυπο, ότι υπάρχουν διάφορες πιθανές λειτουργικές κατηγορίες μορίων τελεστών: σύμπλοκα ενεργοποίησης

όπως οι πρωτεΐνες της ομάδας trithorax (TxG), κατασταλτικά σύμπλοκα, όπως η ομάδα πρωτεϊνών polycomb (PcG), καθώς επίσης και η συνήθης συλλογή μεταγραφικών παραγόντων. Επιπλέον, οι τελεστές μπορούν να εντοπίζονται τόσο *in cis* όσο και *in trans*. Τραβώντας την ιδέα λίγο παραπέρα, κάποια lncRNAs μπορεί να είναι «προσδέτες» που στρατολογούν πολλές τροποποιήσεις της χρωματίνης στις θέσεις σύνθεσής τους (Lee, 2009), ενώ άλλα lncRNAs μπορεί να ενεργούν σε απομακρυσμένα γονίδια ως «οδηγοί» για να επηρεάσουν την επιθυμητή κατάσταση της χρωματίνης.

Βασικές προβλέψεις γι' αυτό το αρχέτυπο των lncRNAs έχουν ως εξής: η καταστροφή του lncRNA θα αλλάξει/παρέμβει την ορθή εντόπιση του μορίου τελεστή ή μπορεί να υπάρξει απώλεια λειτουργίας του ίδιου του τελεστή. Μία διπλή καταστροφή και των δύο πιθανότατα να οδηγήσει σε επιδείνωση του φαινοτύπου αντί να τον διασώσει όπως θα αναμενόταν από το αρχέτυπο «παγίδα».

2.4.1 ΟΔΗΓΟΙ *IN CIS*

Οι έρευνες των τελευταίων χρόνων έχουν ρίξει φως στα πλεονεκτήματα τα οποία προσφέρουν τα RNA στα αλληλία, *cis* περιορισμός και έλεγχος ειδικότητας του εντοπισμού. Ίσως ο πιο έντονα μελετημένος *in cis* μηχανισμός ρύθμισης από τα lncRNAs και καλύτερα κατανοητός, είναι το κέντρο αδρανοποίησης του X στα θηλαστικά (Xic), ένας γενετικός τόπος που προσδιορίζει μία σειρά από ncRNAs, συμπεριλαμβανομένων του Xist (Lee, 2010). Το Xic ελέγχει την αποσιώπηση ενός από τα δύο X στα θηλυκά θηλαστικά, για να επιτευχθεί η σωστή δόση αντιστάθμισης μεταξύ των δύο φύλων. Μία από τις πρώτες αλλαγές που συμβαίνουν κατά την αποσιώπηση ολόκληρου του επιπλέον χρωμοσώματος X, είναι η πρόσληψη του polycomb συμπλόκου καταστολής 2 (PRC2). Το PRC2 ασκείται *in cis* από το RepA RNA, ένα ncRNA 1.6 kb που προέρχεται από το 5' άκρο του Xist. Το RepA μεσολαβεί της πρόσληψης του PRC2 και της τριμεθυλίωσης του H3K27 από τον υποκινητή Xist με αποτέλεσμα τη δημιουργία

«ετεροχρωματικής κατάστασης» (Sun et al, 2006) η οποία απαιτείται για την επαγωγή της μεταγραφής του Xist. Η εξάπλωση του Xist συνοδεύεται από την πρόσληψη του πολυκόμβου και την σύνδεση των τροποποιήσεων της χρωματίνης στο ανενεργό χρωμόσωμα X (Xi). Μία μητρική πρωτεΐνη, η hnRNP U, φάνηκε ότι απαιτείται για τη συσσώρευση του Xist RNA στο Xi (Hasegawa et al, 2010). Το Xist RNA και η hnRNP U αλληλεπιδρούν, η μείωση της hnRNP U προκαλεί την αποκοπή του Xist από το Xi και εντοπίζεται διάχυτα στο πυρηνόπλασμα. Έτσι, το XCI αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της πρόσληψης των δραστηριοτήτων τροποποίησης της χρωματίνης από τα lncRNAs και παρέχει ένα πρωτότυπο μοντέλο για ένα cis μηχανισμό εντοπισμού.

Παρόμοιους μηχανισμούς δράσης φαίνεται να διαδραματίζουν και άλλα lncRNAs με κατασταλτικές μεταγραφικές δραστηριότητες. Το lncRNA Air αποσιωπά το γονίδιο στόχο του, από το πατρικό χρωμόσωμα, μέσω μίας ειδικής αλληλεπίδρασης μεταξύ του ncRNA και της χρωματίνης στον υποκινητή του (Nagano et al, 2008). Συσσωρευμένο Air στον υποκινητή προσλαμβάνει G9a και οδηγεί σε στοχευμένη μεθυλίωση του H3K9 και αποσιώπηση των αλληλίων. Το COLDAIR καλείται να διατηρήσει σταθερή την καταστολή της χρωματίνης. Επίσης παίζει ένα σημαντικό ρόλο στην καθοδήγηση του συμπλόκου PRC2 στη χρωματίνη του FLC, ενός ισχυρού καταστολέα άνθισης, κατά τη διάρκεια της άνοιξης, επηρεάζοντας το γονίδιο καταστολής μέσω τριμεθυλίωσης της H3K27 (Heo & Sung, 2011). Ομοίως, σε ζυμομύκητες, antisense lncRNAs σε πολλές θέσεις του γονιδίου δρουν για την αποσιώπηση της sense μεταγραφής επηρεάζοντας την ακετυλίωση ιστονών και την μεθυλίωση περιοχών. Λαμβάνοντας υπόψιν αυτά τα ευρήματα, βλέπουμε ότι υποδηλώνουν έναν μηχανισμό κατά τον οποίο τα lncRNAs μπορούν να λειτουργήσουν μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασης με τη χρωματίνη για να μεσολαβήσουν στοχευόμενες προσλήψεις των κατασταλτικών δραστηριοτήτων τροποποίησης των ιστονών in cis σε επιγενετική αποσιώπηση μεταγραφής.

Η δυναμική του RNA να προσδένεται σε συμπληρωματικές αλληλουχίες του DNA έχει οδηγήσει πολλούς στις υποθέσεις ότι τα RNAs μπορεί να παίζουν σημαντικό

ρόλο καθοδήγησης στη δημιουργία και τη διαβίβαση της χρωματίνης. Ο Grummt και οι συνεργάτες του έχουν δείξει ότι αυτό μπορεί να είναι ένας σημαντικός μηχανισμός αποδεικνύοντας ότι το pRNA (promoter-associated RNA), ένα ncRNA που είναι συμπληρωματικό στον υποκινητή του ριβοσωμικού DNA, μπορεί να σχηματίσει μία RNA- DNA τριπλέτα στο σημείο σύνδεσης του TTF-1, τον κύριο μεταγραφικό παράγοντα για τη μεταγραφή του ριβοσωμικού RNA (rRNA) από την πολυμεράση I (Schmitz et al, 2010).

Τα lncRNAs συμμετέχουν επίσης στη ρύθμιση των προγραμμάτων γονιδιακής έκφρασης μέσω μεταγραφικών συνενεργοποιητών και συμπλόκων συνκαταστολής όπως η CREB-πρωτεΐνη πρόσδεσης (CBP) και η p300 ιστόνης ακετυλοτρανσφεράσης. Το RBP TLS (εντοπίζεται στο λιποςάρκωμα), είναι γνωστό ότι εμπλέκεται στις χρωμοσωμικές μετατοπίσεις στο σάρκωμα και στην λευχαιμία, το οποίο έχει στρατολογηθεί στη χρωματίνη μέσω ενός lncRNA που παράγεται στον υποκινητή της κυκλίνης D1 προς απάντηση στην ιοντίζουσα ακτινοβολία. Η πρόσδεση του lncRNA στο TLS, με τη σειρά της, προκαλεί μία αλλαγή στη διαμόρφωση του TLS το οποίο επιτρέπει να αμινοτελικά του άκρα να αναστείλουν την δραστηριότητα της ιστόνης ακετυλοτρανσφεράσης των p300 και CBP και έτσι αναστέλλουν τη γονιδιακή έκφραση (Wang et al, 2008). Παρ' όλη την έκταση που χρησιμοποιείται αυτός ο μηχανισμός μένει ακόμη να συσταθεί κάτι, η αναγνώριση των συντηρημένων άκρων των lncRNAs και η παρουσία των RNA σημείων πρόσδεσης σε ένα μεγάλο αριθμό μεταγραφικών ρυθμιστών αυξάνουν την πιθανότητα ότι τα ειδικά σε υποκινητές lncRNAs/ρυθμιστικής συμπεριφοράς, παίζουν σημαντικούς ρόλους στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης *in cis*. Η ανακάλυψη του lncRNA HOTTIP από την ανθρώπινη HoxA ομάδα προσθέτει μία επιπλέον διάσταση στην ρύθμιση *in cis* από τα lncRNAs ορίζοντας ένα κεντρικό ρόλο για τη θηλιά (loop) του χρωμοσώματος παρέχοντας ένα lncRNA στην περιοχή δράσης του. Τα lincRNAs μπορούν να διοργανώσουν τομείς της χρωματίνης για να συντονίσουν την ενεργοποίηση ολόκληρου γονιδίου. Στη θεωρία, η διαμόρφωση του χρωμοσώματος μπορεί να παρέχει ένα μηχανισμό με τον οποίο τα lncRNAs θα μπορούσαν να ρυθμίσουν τη μεταγραφική

δραστηριότητα πολλών συνεχόμενων περιοχών – ένα φαινόμενο που ονομάζεται έλεγχος περιοχών – όπως είναι η ομάδα HOX.

2.4.2 ΟΔΗΓΟΙ IN TRANS

Σε αντίθεση με την ομάδα των cis ρυθμιστικών lncRNAs, υπάρχουν και μερικά παραδείγματα των lncRNAs που ασκούν τις μεταγραφικές τους επιδράσεις στα χρωμοσώματα in trans. Η έκφραση του Hox lncRNA, HOTAIR έχει συσχετισθεί με την μετάσταση στον καρκίνο (Gupta et al, 2010). Αυξημένη έκφραση του HOTAIR παρατηρείται σε πρωτογενή και μεταστατικό καρκίνο. Επιπλέον, η μείωση του HOTAIR στα καρκινικά κύτταρα οδηγεί σε μειωμένη εισβολή των κυττάρων τα οποία εκφράζουν υψηλά επίπεδα polycomb πρωτεϊνών (PRC2). Αυτά τα ευρήματα υποδηλώνουν ότι τα ncRNAs που μεσολαβούν από τη στόχευση των συμπλόκων polycomb είναι ένα κρίσιμο γεγονός στην καρκινογένεση στο μαστό. Συγκεκριμένα, τα lncRNAs όπως το HOTAIR είναι σε θέση να αλλάζουν και να ρυθμίσουν επιγενετικούς τόπους μέσω της στόχευσής του από τα σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης.

Το Jpx, το lncRNA που είναι σημαντικό για την ενεργοποίηση του Xist RNA στο ανενεργό X, ρυθμίζεται αναπτυξιακά και συσσωρεύεται κατά τη XCI (Tian et al, 2010). Το LincRNA-p21 είναι σε θέση να ασκεί την επίδρασή του επί της δομής της χρωματίνης και να προκαλεί την έκφραση του γονιδίου σε πολλαπλές θέσεις του γονιδιώματος. Η έκτοπη έκφρασή του επάγει γονιδιακές αλλαγές έκφρασης και απόπτωση, παρακάμπτοντας την καθοδική ρύθμιση του p53.

2.5 ΤΥΠΟΣ IV: ΙΚΡΙΩΜΑΤΑ

Τα lncRNAs μπορεί να χρησιμεύουν σαν κεντρικές πλατφόρμες πάνω στα οποία συναρμολογούνται σχετικά μοριακά στοιχεία. Σε πολλές βιολογικές διαδικασίες

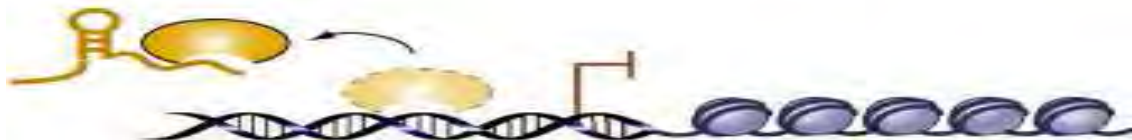
σηματοδότησης, αυτό το χαρακτηριστικό του ακριβή ελέγχου είναι ζωτικής σημασίας για τον ακριβή έλεγχο της ειδικότητας και της δυναμικής των διαμοριακών αλληλεπιδράσεων και των συμβάντων σηματοδότησης (Spitale et al, 2011). Παραδοσιακά, πιστεύεται ότι οι πρωτεΐνες είναι ο κύριος παίκτης στα σύμπλοκα ικριωμάτων (Good et al, 2011). Ωστόσο, πιθανότατα και τα lncRNAs να διαδραματίζουν παρόμοιο ρόλο.

Η τέταρτη αρχετυπική κατηγορία των lncRNAs είναι τα ικριώματα. Αυτή είναι ίσως η πιο περίπλοκη λειτουργικά και σύνθετη κατηγορία όπου τα lncRNAs διαθέτουν διάφορους τομείς που προσδένονται με διακριτά μόρια τελεστών. Τα lncRNAs μπορούν να προσδένουν πολλαπλούς τελεστές-συνεργάτες ταυτόχρονα, το οποίο μπορεί να ενεργοποιήσει τη μεταγραφή ή να δράσει κατασταλτικά, ταυτόχρονα στον ίδιο χώρο και χρόνο.

I. Signal



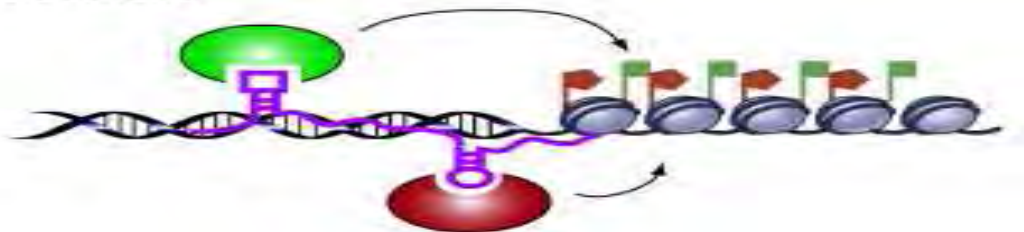
II. Decoy



III. Guide



IV. Scaffold



Εικόνα 3. Σχηματικό διάγραμμα των τεσσάρων αρχέτυπων των μηχανισμών των lncRNAs. Αρχέτυπο 1: ως σήματα, η έκφραση των lncRNAs μπορούν να αντανακλούν πιστά τις συνδυαστικές ενέργειες των μεταγραφικών παραγόντων (χρωματιστά κυκλάκια) ή τη σηματοδότηση μονοπατιών για να δείξει τη γονιδιακή ρύθμιση στο χώρο και το χρόνο. Αρχέτυπο 2: σαν δολώματα, τα lncRNAs μπορούν να καθορίσουν τους παράγοντες μεταγραφής και άλλες πρωτεΐνες μακριά από τη χρωματίνη ή να καθορίσουν τους πρωτεϊνικούς παράγοντες στις υποπεριοχές του πυρήνα. Αρχέτυπο 3: ως οδηγοί, τα lncRNAs μπορούν να προσλάβουν τροποποιητικά ένζυμα χρωματίνης για τη στόχευση γονιδίων, είτε *in cis* (κοντά στην περιοχή παραγωγής των lncRNAs) ή *in trans* σε μακρινά γονίδια στόχους. Αρχέτυπο 4: ως ικριώματα, τα lncRNAs μπορούν να φέρουν κοντά πολλές πρωτεΐνες για να σχηματίσουν σύμπλοκα ριβονουκλεοπρωτεϊνών. Το lncRNA-RNP μπορεί να δρα στην χρωματίνη όπως φαίνεται για να επηρεάσει τις τροποποιήσει των ιστονών. Σε άλλες περιπτώσεις, τα lncRNAs-ικριώματα είναι διαρθρωτικά και σταθεροποιούν τις πυρηνικές δομές ή τα σύμπλοκα σηματοδότησης. (Wang & Chang, 2011)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 : ΓΝΩΣΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ LNCRNAS

3.1 ΠΟΣΑ ΕΙΝΑΙ ΤΑ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΚΑ LNCRNAS ΠΟΥ ΔΙΝΟΥΝ ΤΟ ΠΑΡΟΝ ΣΤΑ ΘΗΛΑΣΤΙΚΑ

Πριν από την πρόοδο που κατέστησε δυνατή την έρευνα των μεταγραφημάτων με τρόπο αμερόληπτο και με ένα μεγαλύτερο βάθος απ' ό,τι ήταν πριν εφικτό, τα lncRNAs ανακαλύφθηκαν και χαρακτηρίστηκαν χρησιμοποιώντας παραδοσιακές μεθόδους κλωνοποίησης γονιδίων. Αρχικά, αυτές οι μεταγραφές ήταν πιθανόν να κωδικοποιούν πρωτεΐνες, αλλά μετέπειτα πειραματικά και βιοπληροφορικά δεδομένα έδειξαν ότι αυτές οι μεταγραφές δεν έχουν μακρά ανοιχτά πλαίσια ανάγνωσης (ORFs). Τα λιγοστά lncRNAs που ήταν γνωστά την περασμένη δεκαετία θεωρούνταν ότι προέκυπταν σποραδικά στο γονιδίωμα. Αυτή η εικόνα άλλαξε ριζικά, όταν, στις αρχές της δεκαετίας του 2000, ο όμιλος FANTOM εξέτασε πάνω από 60 000 πλήρους μήκους cDNAs και εντόπισε πάνω από 11000 lncRNAs στο ποντίκι. Μία σημαντική αναλογία αυτών των μεταγράφων αλληλεπικαλύπτονται και μεταγράφονται στην antisense κατεύθυνση, σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Ως εκ τούτου, αναφέρονται ως φυσικά antisense μετάγραφα (NATs). Μία άλλη ανεξάρτητη έρευνα έδειξε ότι το 40% των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες σε ανθρώπινα κύτταρα, εκφράζουν τα NATs. Επιπλέον, ένας αριθμός μελετών αναφέρουν ότι τα lncRNAs εκφράζονται αποκλειστικά και μόνο από τα ιντρόνια των γονιδίων που κωδικοποιούν πρωτεΐνες (He et al, 2008).

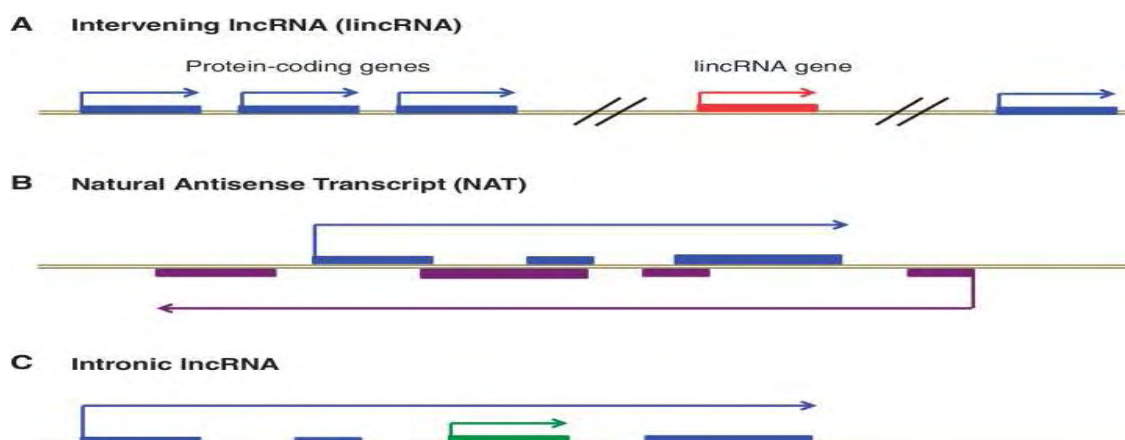
Πιο πρόσφατα, αναφέρθηκε ότι οι «διαγονιδιακές» περιοχές του γονιδιώματος, οι οποίες προηγουμένως θεωρούνταν ότι ήταν «κενές» από γονίδια και ονομάζονταν «junk DNA», επίσης εκφράζουν χιλιάδες lncRNAs, και ονομάζονται μεγάλα παρεμβατικά μη-κωδικοποιούντα RNA (lincRNAs) (Cabili et al, 2011). Πριν τις εξελίξεις στην τεχνολογία αλληλούχισης του RNA (RNA-Seq), τα lincRNAs ανακαλύφθηκαν χρησιμοποιώντας την υπογραφή της χρωματίνης των ενεργών μεταγραφόμενων γονιδίων (Guttman et al, 2009b). Τυπικά, εμφανίζουν

ένα συγκεκριμένο σχέδιο τροποποίησης ιστονών: τριμεθυλίωση του H3K4 στην περιοχή του υποκινητή και τριμεθυλίωση του H3K36 στο σώμα του γονιδίου. Εκτιμάται ότι το ανθρώπινο γονιδίωμα παράγει πάνω από 8000 lincRNAs, από τα οποία τα 4500 θεωρούνται υψηλής αξιοπιστίας. Αυτά τα lincRNAs είναι, πολυεξονικά, καλυμμένα, πολυαδενυλιωμένα και εντοπίζονται στον πυρήνα, στο κυτταρόπλασμα ή και στα δύο. Πολλά από αυτά δείχνουν ιστο-ειδικό μοτίβο έκφρασης υποδηλώνοντας το δυναμικό ρόλο της ταυτότητας του κυττάρου (Cabili et al, 2011).

Ο αριθμός των συνολικών lincRNAs (lincRNAs + NATs + intronic lincRNAs) έχουν εύρος 20 000 μεταγράφων.

Ένα κρίσιμο ζήτημα που εκκρεμεί είναι αν όλα τα lincRNAs είναι λειτουργικά. Κάποιοι ισχυρίζονται ότι η μεταγραφή του δεν είναι λειτουργικής σημασίας, ιδίως αν ληφθεί υπόψιν ότι πολλά από αυτά τα μεταγράφα δεν διατηρούνται ακόμη και στενά είδη συγγένειας (Cabili et al, 2011).

Μέχρι σήμερα έχουν μελετηθεί λειτουργικά 200 lincRNAs. Μία ενδιαφέρουσα υπόθεση είναι ότι πολλά είναι γενετικά περιττά και επομένως η απώλεια ενός lincRNA μπορεί να αντισταθμιστεί από ένα ή περισσότερα άλλα lincRNAs



Εικόνα 3. Τα lncRNAs εμπίπτουν σε τρεις κατηγορίες. (Α) μακρά παρεμβατικά μη κωδικοποιούντα RNA (lincRNAs) μεταγράφονται από περιοχές που είναι μακριά από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. (Β) φυσικά antisense μετάγραφα (NATs) μεταγράφονται από τον απέναντι κλώνο ενός γονιδίου που κωδικοποιεί πρωτεΐνη. (C) ιντρονικά lncRNAs (με το πράσινο χρώμα) μεταγράφονται μεταξύ ιντρονίων από γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. (Moran et al, 2012)

3.1.1 ΓΝΩΣΤΕΣ ΒΙΟΛΟΓΙΚΕΣ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΕΣ ΤΩΝ LNCRNAS

Αν και μόνο ένα πολύ μικρό ποσοστό του συνόλου των lncRNAs έχει ταυτοποιηθεί πειραματικά, ένα εξελισσόμενο παράδειγμα δείχνει ότι συμμετέχουν σε πολλά βιολογικά πλαίσια. Μέχρι στιγμής, τα lncRNAs εμπλέκονται σε διαφορετικές διαδικασίες, όπως η ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης, τόσο in cis όσο in trans, καθοδηγούν τα σύμπλοκα τροποποίησης της χρωματίνης, συμμετέχουν στην απενεργοποίηση του Χ χρωμοσώματος (Xi) και γονιδιωματική αποτύπωση, στον κατακερματισμό του πυρήνα, στις μεταφορές μεταξύ πυρήνα-κυτταροπλάσματος, στο RNA μάτισμα και στον μεταφραστικό έλεγχο (Clark & Mattick, 2011; Mattick et al, 2009; Nagano & Fraser, 2011; Wang & Chang, 2011).

3.2 ΠΕΡΙΣΣΟΤΕΡΑ ΑΠΟ ΔΥΟ ΕΙΔΗ RNA ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΤΩΝ

Το ρεπερτόριο των lncRNAs εμφανίζει δραστηριότητα ενισχυτή και είναι ευρύτερα απ' ό,τι πιστευόταν αρχικά. Η αρχική αναγνώριση των lncRNAs με λειτουργίες ενεργοποίησης επικεντρώθηκε σε μία κατηγορία lncRNAs με γονιδιακούς τόπους που δεν συμπίπτουν με γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες. Αυτά τα lncRNAs εκφράζονται από ανεξάρτητες μονάδες μεταγραφής και είναι κατά κύριο λόγο συγκολλημένα (spliced) και πολυαδενυλιωμένα. Με βάση τη γονιδιωματική τους εντόπιση, αυτά τα lncRNAs ονομάστηκαν διαγονιδιακά ή παρεμβατικά lncRNAs (lincRNAs). Τα lincRNAs με την δράση

ενεργοποίησης ονομάστηκαν ncRNA-activating (ncRNA-a). Πολλά από αυτά τα ncRNA-a ρυθμίζονται κατά την ανάπτυξη και ανταποκρίνονται σε ερεθίσματα διαφοροποίησης.

Από την άλλη πλευρά, lncRNAs που εκφράζονται από απομακρυσμένα ρυθμιστικά στοιχεία, αν και αποκρίνονται σε ερεθίσματα ενεργοποίησης, περιλαμβάνουν μία κατηγορία μονής και διπλής κατεύθυνσης RNA που περιέχει ένα μείγμα από μη-πολυαδενυλιωμένα και πολυαδενυλιωμένα είδη (Kim et al, 2010). Αυτά τα lncRNAs που προκαλούνται από ερεθίσματα, ονομάζονται RNA ενισχυτές (eRNAs) και αποτελούν μία ετερογενή κατηγορία που δεν είναι ακόμη καλά μελετημένη. Εξελισσόμενα στοιχεία δείχνουν ότι παρά τις διαφορές των εν λόγω lncRNAs τάξεων στη βιογένεση, ασκούν τις λειτουργικές τους επιδράσεις σε γειτονικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μέσω ενός κοινού μοριακού υποστηρικτή παρακινώντας τη θηλιά της χρωματίνης να επιτρέψει τις αλληλεπιδράσεις ενισχυτή-υποκινητή (Orom & Shiekhattar, 2013).

3.2.1 ENHANCER – ASSOCIATED LONG NON CODING RNAS

Τα lncRNAs που σχετίζονται με τον ενισχυτή λειτουργούν με βασικές φυσιολογικές διεργασίες. Για παράδειγμα, τα πειράματα ανάλυσης της αναπτυξιακής ρύθμισης της *neurogenin1*, ένας κρίσιμος μεταγραφικός παράγοντας που απαιτείται για την ανάπτυξη του εγκεφάλου, αποκάλυψε την παρουσία ρυθμιστικών στοιχείων που εκφράζουν lncRNAs (Onoguchi et al, 2012). Επιπλέον, μέσω *in vivo* πειραμάτων στα ποντίκια, ένα lncRNA που ονομάζεται NeST, έδειξε να έχει λειτουργίες παρόμοιες με του ενισχυτή, ενεργοποιώντας σε γειτονικό τόπο την ιντερφερόνη και παρέχοντας μικροβιακή ευαισθησία (Gomez et al, 2013). Μολονότι, οι περισσότερες μελέτες έχουν επικεντρωθεί σε γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες μέσω της δράσης των lncRNAs, υπάρχουν επίσης παραδείγματα στα οποία lncRNAs ενεργοποιούν άλλα γειτονικά lncRNAs. Για παράδειγμα, το lncRNA *Jpx* ρυθμίζει τη μεταγραφική

ενεργοποίηση του Xist, ένα lncRNA που είναι σημαντικό για την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος στα κύτταρα των θηλαστικών.

3.2.2 LincRNAs (long intergenic ncRNAs)

Για τον προσδιορισμό των ncRNAs και των αντίστοιχων γονιδίων τους, και για να απλοποιηθεί η ανάλυσή τους προς αποφυγή των επιπλοκών που προκύπτουν από επικάλυψη με άλλους τύπους γονιδίων, πρόσφατα δόθηκε ιδιαίτερη σημασία στα μακρά παρεμβατικά μη κωδικοποιούντα RNAs (lincRNAs, που ονομάζονται επίσης μακρά «διαγονιδιακά» ncRNAs), τα οποία δεν επικαλύπτουν εξόνια ή πρωτεΐνες κωδικοποίησης ή άλλα γονίδια τύπου non-lincRNA.

Τονίζεται ότι τα lincRNAs διαφέρουν στην κατάταξη από τα άλλα RNAs, διότι τα lincRNAs ορίζονται περισσότερο από αυτό που δεν είναι παρά από αυτό που είναι. Τυπικά, τα προϊόντα της RNA πολυμεράσης II είναι σταθερά, τα lincRNAs είναι σχεδόν πάντα καλυμμένα, πολυαδενυλιωμένα και συχνά συγκολλημένα (spliced). Αλλά εκτός από αυτή τη θετική περιγραφή όντας προϊόντα της RNA Pol II, τα lincRNAs ορίζονται χρησιμοποιώντας αρνητικές περιγραφές, για παράδειγμα, δεν κωδικοποιούν για πρωτεΐνες και δεν επικαλύπτουν μετάγραφα ορισμένων άλλων τύπων γονιδίων (Ulitsky & Bartel, 2013).

Σε μοριακό επίπεδο, τα lincRNAs εμφανίζονται δυσδιάκριτα από τα mRNAs με 5'-m⁷GpppN cap δομές, πολυ (A) ουρές, και μάτισμα εξόνιο-εξόνιο, τα οποία διεγείρουν την μετάφραση του mRNA (Shoemaker & Green, 2012). Κατά την εξέταση, αυτές οι λειτουργίες παρόμοιες με των mRNA, σε συνδυασμό με το ότι τα περισσότερα lincRNAs έχουν σημαντική παρουσία στο κυτταρόπλασμα, το ερώτημα δεν είναι γιατί τόσα πολλά lincRNAs είναι συνδεδεμένα με το ριβόσωμα. Το ερώτημα είναι: γιατί μόνο τα μισά από αυτά είναι συνδεδεμένα με το ριβόσωμα; Μελλοντικές έρευνες θα πρέπει να εστιάσουν στο πως ρυθμίζεται ο τρόπος που γίνεται η εξαγωγή των lincRNAs από τον πυρήνα και πως τα κυτταροπλασματικά lincRNAs που δεν εξαρτώνται από uORFs καταφέρουν να αποφύγουν τους μηχανισμούς μετάφρασης (Ulitsky & Bartel, 2013).

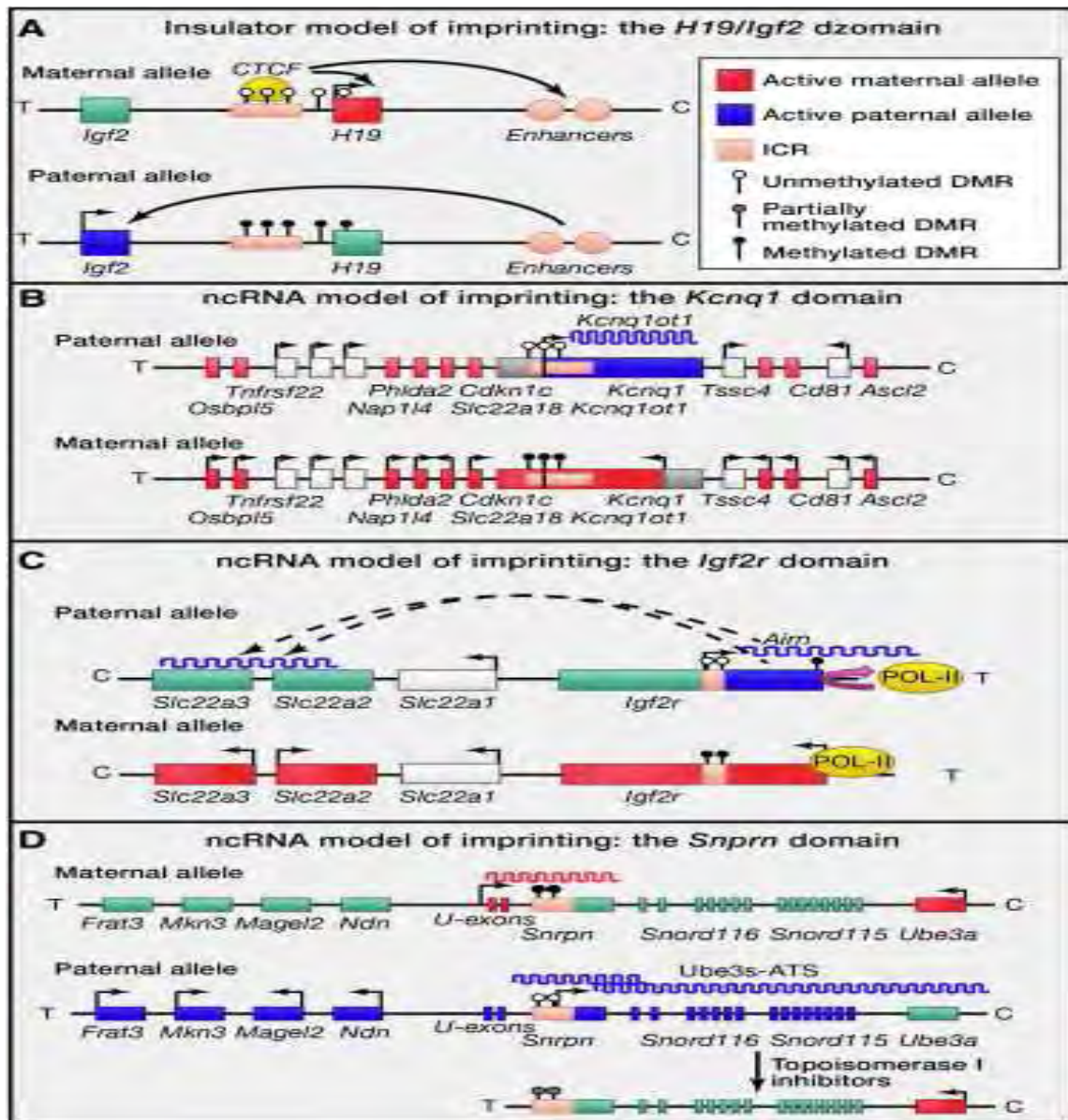
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4: ΠΑΡΑΔΕΙΓΜΑΤΑ ΡΥΘΜΙΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΑΚΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ

4.1 ΓΩΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΗ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗ

Τα θηλαστικά απαιτούν τόσο τη μητρική όσο και την πατρική συνεισφορά του γονιδιώματος για να εξελιχθούν σε υγιείς, βιώσιμους οργανισμούς. Αυτό είναι, σε μεγάλο βαθμό, λόγω της κληρονομιάς των αυτοσωματικών αποτυπωμένων γονιδίων, τα οποία εκφράζονται μόνο από το ένα αλληλόμορφο. Δηλαδή, τα αποτυπωμένα γονίδια εκφράζονται είτε από το μητρικό ή πατρικό αλληλίο που έχουν κληρονομήσει, έτσι ώστε, όταν αθροίζονται σε ολόκληρο το γονιδίωμα, η συνεισφορά και από τους δύο γονείς είναι απαραίτητη για την έκφραση του πλήρους συμπληρώματος των αποτυπωμένων γονιδίων και για τη σωστή ανάπτυξη. Τα κομψά πειράματα πυρηνικής μεταμόσχευσης των Solter και Surani την δεκαετία του 1980 ήταν τα πρώτα που έδειχναν ότι το γονιδίωμα των θηλαστικών φιλοξενεί αποτυπωμένα γονίδια. Έδειξαν ότι διπλοειδή ανδρογενετικά έμβρυα που προέρχονται από δύο προκύτταρα αρρένων ή το αντίστοιχο με δύο κύτταρα θηλέων, απέτυχαν στην ανάπτυξη και το αιτιολόγησαν ότι αυτό μπορεί να οφείλεται στην αποκλειστική έκφραση κάποιων γονιδίων από το ένα γονικό γονιδίωμα. Αργότερα, γενετικά πειράματα επέκτειναν τα ευρήματα αυτά, αποδεικνύοντας ότι τα προτεινόμενα αποτυπωμένα γονίδια χαρτογραφούνται σε συγκεκριμένα χρωμοσώματα στα ποντίκια (Lee & Bartolomei, 2013).

Ο τρέχων αριθμός των αποτυπωμένων γονιδίων στον ποντικό είναι περίπου 150 (<http://www.mousebook.org/catalog.php?catalog=imprinting>), με έναν μικρότερο αριθμό να προσδιορίζεται στον άνθρωπο, εξαιτίας του ότι πολλά γονίδια δεν έχουν δοκιμαστεί ακόμη σε ανθρώπους. Τα αποτυπωμένα γονίδια συνήθως βρίσκονται σε ομάδες των 3-12 (ή περισσότερων) γονιδίων, τα οποία είναι

κατανεμημένα σε 20-3.700 kb του DNA, αλλά περιέργως τα γονίδια από μία ομάδα δεν εκφράζονται απαραίτητα από το ίδιο γονικό χρωμόσωμα (εικόνα 4).



Εικόνα 4. ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ

(Α) Το μοντέλο απομόνωσης δίδεται παραδειγματικά από την περιοχή *H19/Igf2*. Εδώ η διαγονιδιακή ICR είναι μεθυλιωμένη στην πατρικής προέλευσης. Σχετικά με το μη μεθυλιωμένο μητρικής προέλευσης αλληλόμορφο, η πρόσδεση του CTCF αποτρέπει τους ενισχυτές να αλληλεπιδράσουν με τον υποκινητή του *Igf2*. Αντ'αυτού οι ενισχυτές ενεργοποιούν την έκφραση του *H19*. Στο πατρικό

αλληλόμορφο, η μεθυλίωση της ICR εξαπλώνεται στον υποκινητή του H19, αποσιωπώντας την έκφρασή του, και αποτρέπει το CTCF να προσδεθεί στην ICR, επιτρέποντας στους ενισχυτές να ενεργοποιήσουν την έκφραση του Igf2

(B-D) Το μοντέλο των ncRNA απεικονίζεται στις περιοχές Kcnq1 (B), Igf2r (C), και Snrpn (D)

(B) Για το Kcnq1, η ICR περιέχει τον υποκινητή του lncRNA Kcnq1ot1. Στο πατρικό αλληλόμορφο, η ICR είναι μη μεθυλιωμένη, επιτρέποντας την έκφραση του Kcnq1ot1. Η έκφραση του Kcnq1ot1 αποσιωπεί το πατρικό αλληλόμορφο των συνδεδεμένων γονιδίων *in cis*. Στο μητρικό αλληλόμορφο, το Kcnq1ot1 δεν εκφράζεται λόγω της μεθυλίωσης της ICR, και εκφράζονται τα γειτονικά αποτυπωμένα γονίδια.

(C) Στην περιοχή Igf2, η μεταγραφή του lncRNA Airn διέπεται από έναν υποκινητή εντός της ICR και εκφράζεται από το μη μεθυλιωμένο πατρικό αλληλόμορφο. Στα σωματικά κύτταρα, η μεταγραφή του Airn πάνω από τον υποκινητή του Igf2 αποκλείει την έκφραση του Igf2, εν μέρει από τον «διωγμό» της RNA πολυμεράσης II μακριά από τον υποκινητή. Στις εμβρυονικές σειρές το lncRNA Airn απαιτείται για την πρόσληψη ενζύμων τα οποία παρέχουν κατασταλτικές τροποποιήσεις των ιστονών για να αποσιωπήσουν κάποια γονίδια *in cis*.

(C) Η περιοχή Snrpn χρησιμοποιεί το μοντέλο των ncRNA. Το Ube3a εκφράζεται στον εγκέφαλο αποκλειστικά από το μητρικό αλληλόμορφο. Το lncRNA στο πατρικό αλληλόμορφο εμφανίζεται σε πολλαπλές, ποικίλες επεξεργασμένες μορφές, μερικές από τις οποίες είναι εγκέφαλο – ειδικές παραλλαγές που περιέχουν ανοδικά υποκινητές / εξόνια και αλληλουχίες που επικαλύπτονται από Ube3a. Η έκφραση αυτών των lncRNAs συμβαίνει όταν η ICR είναι μη μεθυλιωμένη, με αποτέλεσμα να καταστέλλεται η έκφραση του Ube3a. Στο μητρικό αλληλόμορφο, η μεταγραφή των ανοδικών (U) εξονίων προτείνεται να κατευθύνει τη μεθυλίωση της μητρικής αποτύπωσης στην ICR. Αναστολείς της τοποϊσομεράσης I προσδιορίστηκαν από μία ενεργή αλληλουχία του Ube3a στο πατρικό αλληλόμορφο στο ποντίκι. Με αποτέλεσμα τα Snrpn και Ube3a-ATS να μην εκφράζονται πλέον και η ICR να παρουσιάζει αυξημένη μεθυλίωση, σε σχέση με του άγριου – τύπου πατρικό αλληλόμορφο.

Όλες οι αποτυπωμένες περιοχές, οι οποίες δεν είναι όλες σχεδιασμένες στην κλίμακα, απεικονίζονται για το ποντίκι, αν και οι ανθρώπινες περιοχές είναι σε μεγάλο βαθμό συντηρημένες. Το Τα αναφέρεται στο τελομερικό άκρο του συμπλέγματος και το C στο εγγύς άκρο του χρωμοσώματος. (Lee & Bartolomei, 2013)

Οι περισσότερες από αυτές τις ομάδες περιέχουν γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες και ncRNAs. Τα ncRNAs είναι από διαφορετικά είδη (microRNAs, snoRNAs, and lncRNAs), μερικά από τα οποία είναι απαραίτητα για τον μηχανισμό που αποτυπώνει αυτά τα γονίδια *in cis*. Κάθε καλά μελετημένη ομάδα έχει μία διακριτή περιοχή ελέγχου αποτύπωσης (imprinting control region - ICR), που περιέχει γονικής προέλευσης επιγενετικές τροποποιήσεις (μεθυλίωση του DNA και μετα-μεταφραστικές τροποποιήσεις των ιστονών) και διέπει την αποτύπωση του τόπου.

Πολλά αποτυπωμένα γονίδια υφίστανται ιστοειδική αποτύπωση. Από τα περίπου 150 αποτυπωμένα γονίδια που ταυτοποιήθηκαν στο ποντίκι, μερικά έχουν αποτυπωθεί αποκλειστικά στον πλακούντα, ένα έξτρα εμβρυονικό όργανο που παίζει κρίσιμο ρόλο στη ρύθμιση της ανάπτυξης του εμβρύου με τον έλεγχο της πρόσληψης των θρεπτικών συστατικών. Αποτύπωση υποτίθεται ότι είναι ένας μηχανισμός για την εξισορρόπηση της ανάπτυξης, με πολλά αποτυπωμένα γονίδια να έχουν αποδεδειγμένο ρόλο στον έλεγχο της ανάπτυξης. Έτσι, ο πλακούντας είναι ιδιαίτερα σημαντικός στη φυσιολογία και στην μελέτη της αποτύπωσης.

4.1.1 ΣΥΓΓΕΝΕΙΣ ΠΑΘΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΑΠΟΤΥΠΩΣΗΣ

Εξαιτίας των επιπτώσεων γονικής προέλευσης, σύνδρομα ανθρώπινων ασθενειών μπορούν να προκύψουν από γενετικές ή επιγενετικές ανωμαλίες μόνο στο ένα αλληλόμορφο γονικής προέλευσης. Στην πραγματικότητα, οι περισσότερες καλά καθορισμένες ομάδες αποτυπωμένων γονιδίων σχετίζονται με ανθρώπινες ασθένειες. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανώμαλη έκφραση των ICR-συνδεδεμένων με lncRNAs που μπορεί να εμπλέκονται σε διάφορες διαταραχές αποτύπωσης. Δύο από τα καλά μελετημένα σύνδρομα που σχετίζονται με την αποτύπωση, είναι το Prader Willi Syndrome (PWS) και το Angelman Syndrome και εντοπίζονται στο χρωμόσωμα 15. Το PWS συμμετέχει στην απώλεια της λειτουργίας αριθμού γονιδίων στο 15q11-13. Οι άνθρωποι με PWS είναι παχύσαρκοι, έχουν μειωμένο μυϊκό τόνο και παρουσιάζουν ψυχοκινητική καθυστέρηση. Το Angelman Syndrome είναι μία σύνθετη διαταραχή του νευρικού συστήματος και προκύπτει από την απώλεια λειτουργίας του γονιδίου UBE3A. Τα συμπτώματα περιλαμβάνουν καθυστερημένη ανάπτυξη, διανοητική αναπηρία και σοβαρή διαταραχή της ομιλίας. Οι περισσότερες περιπτώσεις PWS και AS συνεπάγονται με μεγάλες διαγραφές που περιέχουν τα αποτυπωμένα γονίδια από το χρωμόσωμα στο οποίο εκφράζονται. Στο PWS υπάρχει διαλληλική καταστολή της ICR που σχετίζεται με lncRNAs. Στο AS, το lncRNA εκφράζεται διαλληλικά. Ένας μικρότερος αριθμός των περιπτώσεων

προκύπτουν είτε από τη διαγραφή ή από παρεκκλίνουσα αλληλομορφική μεθυλίωση του DNA στην ICR, που οδηγούν σε αλλαγές έκφρασης. Σύμφωνα με μία πρόσφατη ανακάλυψη μίας νέας τάξης lncRNAs, τα sno-lncRNAs, είναι πιθανό η απουσία του sno-lncRNA στην κρίσιμη περιοχή του PWS να βλάπτει το εγκεφαλο-ειδικό μάτισμα πιθανώς λόγω του εσφαλμένου εντοπισμού των Fox παραγόντων ματίσματος.

Το σύνδρομο Beckwith-Wiedemann (BWS), μία διαταραχή της υπερανάπτυξης, και το σύνδρομο Silver-Russell (SRS), μία διαταραχή υποανάπτυξης και ασυμμετρίας, είναι δύο καλά μελετημένες διαταραχές αποτύπωσης που χαρτογραφούνται στη χρωμοσωμική περιοχή 11p15.5, όπου κατοικούν το IGF2 και H19. Σε αντίθεση με το PWS και AS, η πλειοψηφία των ατόμων με BWS και SRS έχουν επιγενετικά λάθη. Για παράδειγμα, πάνω από τις μισές περιπτώσεις με BWS εμφανίζουν απώλεια μεθυλίωσης στην KCNQ1 ICR, η οποία οδηγεί σε διαλληλική έκφραση του KCNQ1OT1 lncRNA. Ακατάλληλη έκφραση του lncRNA μπορεί να οδηγήσει σε παρεκκλίνουσα καταστολή, *in cis*, των γονιδίων που σχετίζονται με τη νόσο – σ' αυτή την περίπτωση, αποσιωπήθηκε το CDKN1C. Επιπλέον, κάποιοι BWS ασθενείς εμφανίζουν υπερέκφραση του IGF2. Οι περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις έχουν μικρές ελλείψεις στην ICR στο μητρικό αλληλόμορφο, οι οποίες διαταράσσουν τον CTCF – εξαρτώμενο απομονωτήρα, ο οποίος οδηγεί σε διαλληλική έκφραση του IGF2 και απώλεια του H19. Περιέργως, οι υπόλοιπες αλληλουχίες στην ICR σε αυτά τα άτομα, είναι υπερμεθυλιωμένες. Πολλά άτομα με SRS έχουν αντίθετο επιγενετικό φαινότυπο, όπου η ICR είναι μη μεθυλιωμένη, με αποτέλεσμα τη διαλληλική έκφραση του H19 και απώλεια του IGF2. Σε πολλές από αυτές τις περιπτώσεις, δεν είναι σαφές ποια εκδήλωση οδηγεί σε υπομεθυλίωση του DNA, αλλά σε ορισμένες περιπτώσεις, πολλαπλές αποτυπωμένες περιοχές προκαλούν απώλεια μεθυλίωσης της ICR. Αξίζουν να σημειωθούν μερικά παραδείγματα απώλειας πολλαπλών περιοχών αποτύπωσης που περιλαμβάνουν μεταλλάξεις στο ZFP57, μία πρωτεΐνη ψευδαργύρου που συμμετέχει στη συντήρηση των γονιδιωματικών αποτυπωμάτων κατά τη γονιμοποίηση, η οποία αναφέρθηκε για πρώτη φορά σε άτομα που παρουσίασαν παροδικό νεογνικό διαβήτη. Είναι

πιθανό ότι πρωτεΐνες που δεν έχουν ακόμη εντοπιστεί μπορεί να μεταλλάσσονται σε άλλες περιπτώσεις απώλειας της μεθυλίωσης. Εναλλακτικά, αρχικές προσβολές στο περιβάλλον μπορεί να επηρεάσουν τα μοτίβα μεθυλίωσης του DNA (βλ. Αποτύπωση και Τεχνολογία Υποβοηθούμενης Αναπαραγωγής ως παράδειγμα).

4.2 X INACTIVATION

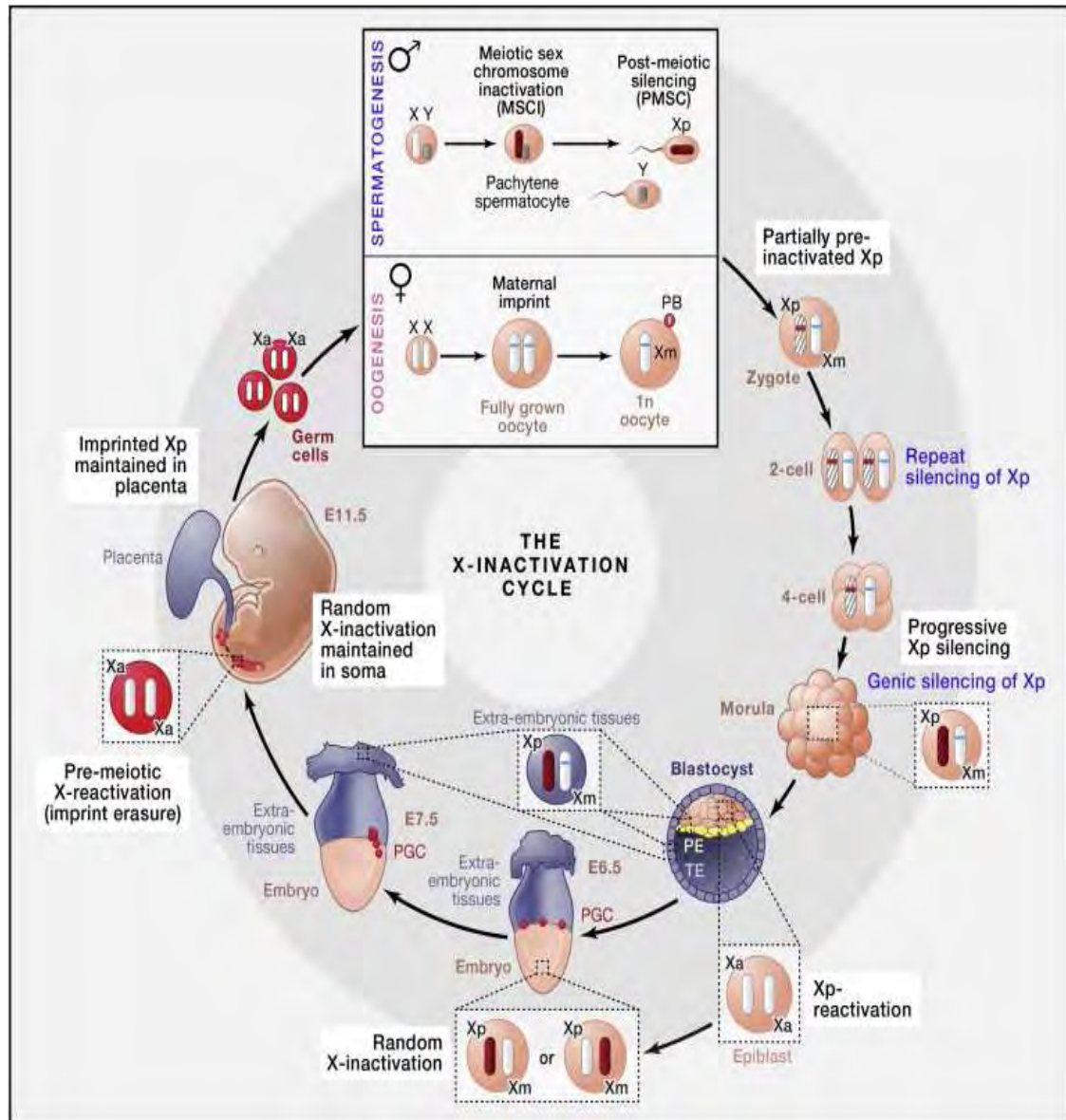
Τα RNA του Xic (X inactivation center) παρέχουν ένα πλαίσιο για την κατανόηση του πως λειτουργεί το υπόλοιπο του γονιδιώματος. Εντός του Xic τόσο με *in cis* δράση (π.χ Tsix) όσο και με *in trans* δράση (π.χ Jpx) βρίσκονται lncRNAs. Αυτά τα X συνδεδεμένα lncRNAs μπορούν είτε να είναι ενεργοποιητικά (Jpx) είτε κατασταλτικά (Tsix). Αλληλεπιδρούν με παράγοντες μεταγραφής (π.χ YY1, CTCF) και σύμπλοκα τροποποίησης χρωματίνης (π.χ PRC2, Dnmt3a). Το Xic παρέχει επίσης ένα μοντέλο με το οποίο μπορούν να μελετηθούν τα ζεύγη sense–antisense και ο ρόλος των RNA στην αρχιτεκτονική ολόκληρης της κλίμακας της χρωματίνης. Επιπλέον, έχει γίνει σαφές ότι τα lncRNAs στο Xic είναι ζωτικής σημασίας όχι μόνο κατά την πρώιμη εμβρυογένεση, όταν λαμβάνει χώρα η αντιστάθμιση της δοσολογίας, αλλά και καθ' όλη τη διάρκεια της ενήλικης ζωής. Βασικές ομοιοστατικές λειτουργίες των lncRNAs έχουν αποκαλύψει ότι όταν διαγράφεται ένα μέλος (Xist), έχουμε ως αποτέλεσμα μία θανατηφόρο νόσο (καρκίνος). Το φαινόμενο της αδρανοποίησης του X χρωμοσώματος και κάποιου άλλου αλληλίου φαίνεται να καλλιεργούν πρόσφορο έδαφος για την αποκάλυψη απροσδόκητων βιολογικών γεγονότων (Lee & Bartolomei, 2013).

4.2.1 XIST ΚΑΙ ΚΑΡΚΙΝΟΣ

Πολλές έρευνες έχουν επικεντρωθεί στην αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος κατά την πρώιμη ανάπτυξη του εμβρύου. Ωστόσο, είναι πλέον σαφές ότι το Xist διαδραματίζει ένα σημαντικό ρόλο στην μετέπειτα εξέλιξη και στους ενήλικες.

Στους εμβρυϊκούς ινοβλάστες του ποντικού, διαγραφή του Xist στο Xi οδηγεί σε μερική X επανενεργοποίηση . Από την στιγμή που το XCI προκαλεί την αποσιώπηση αρκετών εκατοντάδων γονιδίων, μερικά από τα οποία είναι ογκογονίδια, ακατάλληλη έκφραση του Xist θα μπορούσε να είναι δυνητικά ένας μηχανισμός υποκείμενης ογκογένεσης. Πρώιμα πειράματα προτείνουν μία δελεαστική σύνδεση μεταξύ της δοσολογία των X συνδεδεμένων γονιδίων και καρκίνου. Απώλεια του XCI και καταστολή της έκφρασης του Xist παρατηρούνται συχνά σε καρκίνους, όπως ο καρκίνος του μαστού και των ωοθηκών. Απώλεια του Xist συχνά προκαλείται από δισωμία του X, όπου χάνεται το Xi και ενισχύεται το Xa. Επαναδραστηριοποίηση του Xi μπορεί να είναι ένας εναλλακτικός μηχανισμός που οδηγεί σε απώλεια του Xist και υπερέκφραση του X. αυτές οι παρατηρήσεις αποδεικνύουν μια συσχέτιση μεταξύ δυσλειτουργίας του X χρωμοσώματος και καρκίνου. Η σύνδεση μεταξύ XCI και καρκίνου φάνηκε να είναι αιτιώδης, με το εύρημα ότι διαγράφοντας το Xist στο διαμέρισμα του αίματος, προκαλείται μία επιθετική μυελοϋπερπλαστική νεοπλασία και το μυελοδυσπλαστικό σύνδρομο (mixed MPN-MDS) με 100% διεισδυτικότητα και θνησιμότητα στα ποντίκια. Αυτό το αποτέλεσμα σαφώς παρουσιάζει ότι η απώλεια του Xist RNA και η υπερέκφραση του X στους ιστούς μπορεί να οδηγήσει σε καρκίνο. Όπως το Xist RNA προωθεί την έναρξη ή την πρόοδο του καρκίνου, ίσως να ήταν λογικό να προταθεί η επανενεργοποίηση του Xist ως θεραπευτική στρατηγική για τον καρκίνο. Είναι γνωστό ότι η έκτοπη έκφραση του Xist σε ενήλικα ποντίκια μπορεί να οδηγήσει σε έκτοπη αποσιώπηση γονιδίου in cis και το θάνατο των κυττάρων σε ανώριμες πρόδρομες ουσίες του ανοσοποιητικού συστήματος. Θεραπευτικές στρατηγικές μπορεί να περιλαμβάνουν μικρά μόρια. Πράγματι, θεωρείται προτεραιότητα, όταν κάποιος κοιτάξει το σύνδρομο Angelman, μία συγγενή διαταραχή που προκαλείται από τη μητρική απαλοιφή ή μετάλλαξη του αποτυπωμένου Ube3a αλληλίου. Το Ube3a είναι γνωστό ότι ελέγχεται από ένα long antisense μετάγραφο από την περιοχή Snrpn. Στους όγκους, η έκφραση του Xist μπορεί επίσης να επανενεργοποιηθεί από μικρά μόρια, προσφέροντας μία νέα

θεραπευτική προσέγγιση που θα στόχευε επιγενετικά λειτουργικά lncRNAs (Froberg et al, 2013).



Εικόνα 5. ΑΔΡΑΝΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ Χ ΚΑΙ Χ-ΕΠΑΝΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΠΟΝΤΙΚΟΥ

Η δοσολογία στα θηλαστικά συμβαίνει μέσα σε ένα συνεχή κύκλο XCI και επανενεργοποίησης του X χρωμοσώματος. Ο κύκλος του XCI αρχίζει στη βλαστική σειρά των αρσενικών. Κατά τη διάρκεια της πρώτης μειωτικής πρόφασης στη σπερματογένεση, το X και Y υποβάλλονται σε MSCl. Μετά τη μείωση το 85% των X συνδεδεμένων γονιδίων παραμένουν κατασταλαμένα μέσω της σπερμιόγένεσης μετά μειωτική

χρωματίνη συνδεδεμένη με το φύλο (post meiotic sex chromatin - PMSC). Αυτό το αδρανοποιημένο X της βλαστικής σειράς έχει προταθεί για να περάσει στην επόμενη γενιά με μία μερικώς σιωπηλή κατάσταση, αντιπροσωπεύοντας την προτίμηση αδρανοποίησης του XR στα πρόωρα θηλυκά έμβρυα του ποντικού. Στο έμβρυο ποντικού δύο κυττάρων, τα επαναλαμβανόμενα στοιχεία στο XR έχουν ήδη κατασταλεί. Τα XR-συνδεδεμένα κωδικοποιούντα γονίδια είναι αρχικά ενεργά αλλά σταδιακά απενεργοποιούνται κατά την διαδικασία της προεμφυτευτικής. Η βλαστική σειρά μητρικής προέλευσης παίζει επίσης καθοριστικό ρόλο στο αποτυπωμένο XCI σημειώνοντας το μέλλον των XM κατά τη διάρκεια της φάσης ανάπτυξης των ωοκυττάρων, εξασφαλίζοντας ότι το XM προστατεύεται και στα XX και στα XY έμβρυα. Πέρα από τη βλαστοκύστη, αυτά τα σημάδια παραμένουν μόνο στη βλαστοκύστη του ποντικού. Εκτιμώντας τους εξτραεμβρυονικούς ιστούς, συμπεριλαμβάνοντας του πρωτόγονου ενδοδέρματος (PE) και τροφοεξωδέρματος (TE), διατηρώντας την αποτυπωμένη XR αδρανοποίηση, η βλαστική σειρά υποβάλλεται στο XCR και οδηγεί τα ζυγωτά τυχαία στο XCI. Το XCR εμφανίζεται επίσης σε αρχέγονα βλαστικά κύτταρα (PGCs) στο πλαίσιο της προετοιμασίας για τον ίσο διαχωρισμό κατά τη διάρκεια της μείωσης. (Payer & Lee, 2008)

4.2.2 X – ΣΥΝΔΕΔΕΜΕΝΕΣ ΕΠΙΡΡΟΕΣ, ΝΟΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΙΦΟΡΑ

Το χρωμόσωμα X φιλοξενεί περίπου 1000 γονίδια, πολλά από τα οποία οδηγούν σε ευδιάκριτους ανθρώπινους φαινοτύπους όταν μεταλλάσσονται. Οι X συνδεδεμένες ασθένειες που προκύπτουν από μονές γονιδιακές μεταλλάξεις, οι οποίες μπορούν να χαρακτηριστούν ως επικρατείς ή υπολειπόμενες, με την πρώτη εμφάνιση και στα XX και στα XY άτομα και στην δεύτερη κυρίως στα XY άτομα επειδή τους λείπει ένα αλληλόμορφο άγριου τύπου. Οι X – συνδεδεμένες μεταλλάξεις μπορούν να προκαλέσουν σοβαρές ασθένειες, όπως hemophilia A (FVIII), Duchenne muscular dystrophy (DMD), Rett syndrome (MECP2), και fragile X syndrome (FMR1), ή λιγότερο σοβαρές παθήσεις όπως απώλεια διάκρισης κόκκινου-πράσινου κατά την όραση και το αρσενικό μοτίβο φαλάκρας. Εξαιτίας της διαφορετικής κληρονομιάς των φυλετικών χρωμοσωμάτων και της ημίζυγης κατάστασης του χρωμοσώματος X στον ανδρικό πληθυσμό, έχουν περιγραφεί περισσότερες ασθένειες για το χρωμόσωμα X παρά για κάθε άλλη ασθένεια.

Όπως τα X – συνδεδεμένα γονίδια υπάρχουν στην ημίζυγη κατάσταση σε ένα μεγάλο μέρος της ιστορίας των φυλετικών χρωμοσωμάτων, έτσι το X

χρωμόσωμα έχει εμπλακεί στην επιλογή των φυλετικών διμορφικών χαρακτηριστικών για πάνω από 300 χρόνια από τότε που το X και το Y άρχισαν να αποκλίνουν. Γονίδια για τον φυλετικό διμορφισμό, αναπαραγωγής και νοητικής λειτουργίας εμπλουτίζονται στο χρωμόσωμα X, με τη γενετική τους βατότητα να τα καθιστά εύκολα υποστρώματα για την εξελικτική επιλογή. Στα ποντίκια, η έλλειψη του XCI (κωδικοποιημένο lncRNA, Tsix), έχει αποδειχθεί ότι μειώνει τον φόβο και ενισχύει τη βραχυπρόθεσμη μνήμη του ιππόκαμπου στα αρσενικά ποντίκια. Το γεγονός ότι πολλά X συνδεδεμένα γονίδια εκφράζονται στον εγκέφαλο, κάποια με ένα φυλο – ειδικό τρόπο, μπορούν να εξηγήσουν γιατί η νοητική υστέρηση και ο αυτισμός είναι έως και δέκα φορές συχνότερα στους άνδρες, αν και οι υποκείμενες μεταλλάξεις δεν είναι γνωστές για πολλές τέτοιες διαταραχές. Η γενετική βατότητα των X – συνδεδεμένων απλότυπων έχει υποτεθεί για να αυξήσει την πιθανότητα εκδήλωσης ακραίας συμπεριφοράς και νοητικών φαινοτύπων στους άνδρες, και η πιθανότητα θα μπορούσε επίσης να αυξηθεί στα θηλυκά όταν το πρότυπο XCI κλίνει για να ευνοηθεί η έκφραση του X_m. Το προφίλ του XCI και ο μωσαϊκισμός ποικίλλουν σε μεγάλο βαθμό μεταξύ των θηλυκών ανθρώπων, ίσως αντιπροσωπεύουν μεγαλύτερη φαινοτυπική διακύμανση για τις γυναίκες. Γονίδια που ποικιλοτρόπως διαφεύγουν του XCI συμβάλλουν προς αυτή την κατεύθυνση. Στο ποντίκι, X – συνδεδεμένοι τροποποιητές όπως το Xce μπορούν να παραποιήσουν τις αναλογίες του XCI, παρέχοντας ένα μηχανισμό με τον οποίο θα μπορούσαν να παραχθούν μη τυχαία μοτίβα XCI. Επίσης, μη τυχαίο XCI δεν είναι ασυνήθιστο σε γυναίκες.

Στον τομέα της νοητικής ανάπτυξης και συμπεριφοράς, η μελέτη των X χρωμοσωμικών μονοσωμιών (XO, Turner syndrome), έχει παίξει σημαντικό ρόλο στην αποσαφήνιση των X – συνδεδεμένων συνεισφορών. Τα κορίτσια με σύνδρομο Turner συνήθως έχουν φυσιολογική λεκτική νοημοσύνη αλλά είναι λιγότερο ανεπτυγμένες στις μαθηματικές δεξιότητες. Συγκρίνοντας τα κορίτσια με σύνδρομο Turner, τα οποία έχουν κληρονομήσει το χρωμόσωμα X από την μητέρα (X_mO) αντί του πατέρα (X_pO), μία μελέτη κατέληξε στο συμπέρασμα ότι το X_p συσχετίστηκε με αυξημένη κοινωνική νοητική λειτουργία. Παρά των γονοτυπικών τους ομοιοτήτων, τα επιγενετικά διαφορετικά X_mO και X_pO

κορίτσια απέδειξαν μετρήσιμες φαινοτυπικές διαφορές στην κοινωνική προσαρμοστικότητα. Το γεγονός ότι το Χr χρωμόσωμα κληρονομείται μόνο από τις κόρες έχει οδηγήσει κάποιους να προτείνουν ότι αντιπροσωπεύει καλύτερες κοινωνικές δεξιότητες κατά μέσο όρο στα κορίτσια. Τα ΧrO και ΧmO κορίτσια εμφανίζουν επίσης διαφορές στην οπτική μνήμη και στη δομή του εγκεφάλου. Υποψήφια γονίδια που περιλαμβάνονται στο μικρό βραχίονα του Χ χρωμοσώματος είναι το USP9X, MAOA, και MAOB (monoamine oxidases).

Γονίδια στο χρωμόσωμα Χ μπορούν να αποτυπωθούν με ειδικότητα σε ιστούς, ιδίως στον εγκέφαλο όπου εκφράζονται πολλά Χ συνδεδεμένα γονίδια. Μία ανάλυση του γονιδιώματος του εγκεφάλου του ποντικού προτείνει ότι εκατοντάδες αλληλόμορφα στο Χm μπορεί να εκφράζονται κατά προτίμηση στους γλουταμινεργικούς νευρώνες του φλοιού στο θηλυκό. Παρόλο που τα Χr αλληλόμορφα δεν έχουν αποσιωπηθεί, εκφράζονται σε χαμηλότερα επίπεδα. Αυτό το είδος της μερικής αποτύπωσης μπορεί να συμβάλλει στις νοητικές διαφορές και στην συμπεριφορά. Αναλύσεις παρακολούθησης από αναλύσεις ολόκληρου του γονιδιώματος έχουν υποστηρίξει ότι η στρέβλωση των αλληλίων μπορεί να είναι ένας παραλογισμός που προκαλείται από αδικημένους στατιστικούς περιορισμούς μιας νέας τεχνολογίας. Έτσι, το ερώτημα σε πόσους και ποιους ιστούς μπορούν να εμφανιστούν τα Χ – συνδεδεμένα γονίδια στα θηλαστικά παραμένει ανοιχτό.

4.3 ΕΠΙΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΕΠΑΝΑΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΙΣΜΟΣ ΣΕ ΑΝΘΡΩΠΙΝΑ ΒΛΑΣΤΙΚΑ ΚΥΤΤΑΡΑ

Το Xist RNA επηρεάζει επίσης τον πληθυσμό των πολυδύναμων βλαστικών κυττάρων, όπως φαίνεται από πρόσφατες μελέτες επαγόμενες από πολυδύναμα βλαστικά κύτταρα (iPSC) στην αναγεννητική ιατρική. Σε ποντικούς το ΧCI είναι στενά συνδεδεμένο με την διαφοροποίηση του κυττάρου στην επιβλάστη και επίσης η κατοχή των δύο Χα είναι ένα χαρακτηριστικό γνώρισμα των πολυδύναμων κυττάρων του ποντικού (ESC και iPSC). Η σφιχτή σύνδεση

εξηγείται από τη φυσική σύγκλιση πολλών πολυδύναμων παραγόντων όπως OCT4, SOX2, NANOG, και REX1, στο Xic, και ειδικότερα εντός των περιοχών ελέγχου των Xite, Tsix, και Xist. Η πρόσδεση των πολυδύναμων παραγόντων σε αυτές τις περιοχές δεσμεύουν την έναρξη του XCI, και η απώλεια της πρόσδεσης κατά τη διαφοροποίηση του κυττάρου δημιουργεί μία κατάσταση επιτρεπτή για την έναρξη του XCI.

Το Xist παρέχει μία από τις λίγες απτές αναγνώσεις για την ποιότητα των βλαστικών κυττάρων. Στα ανθρώπινα ESC (hESC) και iPSC (hiPSC) η έκφραση του Xist και XCI δεν εμφανίζονται κατ' ανάγκη με τον αναμενόμενο τρόπο. Οι θηλυκές σειρές hESC και hiPSC εμφανίζονται σε τρεις διαφορετικές επιγενετικές ομάδες με βάση την έκφραση του Xist. Τα κύτταρα της «τάξης I» μοιάζουν με τα mESC στο γεγονός ότι έχουν δύο Xa στην αδιαφοροποίητη κατάσταση. Όταν τοποθετούνται σε συνθήκες διαφοροποίησης τα κύτταρα της τάξης I εκφράζουν το Xist και προκαλούν την έναρξη του XCI. Τα κύτταρα της «τάξης II» εκφράζουν ήδη το Xist και φέρουν ένα Xi ακόμη και πριν την ανάπτυξη σε συνθήκες διαφοροποίησης. Τέλος, τα κύτταρα της «τάξης III» μόλις εκφράζουν το Xist, χάνει αμετάκλητα την έκφρασή του, με απόδειξη την μερική X επανενεργοποίηση. Η επιγενετική ρευστότητα είναι εμφανής μέσα από μία μη αναστρέψιμη εξέλιξη από τις τάξεις I, II, III. Η τάξη I είναι παροδική, ενώ η τάξη III είναι κυρίαρχη και σταθερή.

Παρόλο που η αστοχία της έκφρασης του Xist είναι θανατηφόρος *in vivo*, η απώλεια του Xist δεν έχει τις ίδιες ολέθριες συνέπειες *ex vivo*, αν και αυτά τα κύτταρα έχουν πλήρη έλλειψη αναπτυξιακής δυναμικότητας. Τα hiPSC (Human Induced pluripotent stem cell) της τάξης III έχουν περιορισμένη ικανότητα διαφοροποίησης. Σε ένα μοντέλο ξενομοσχεύματος, τα hiPSC της τάξης III παράγουν κυστικό τεράτωμα, το οποίο αποτελείται από απλό κυστικό επιθήλιο και μη διαφοροποιημένο μεσέγχυμα, ενώ τα κύτταρα της τάξης II παράγουν καλά διαφοροποιημένες δομές από τρεις βλαστικές στρώσεις. Δεδομένου του ογκογόνου φαινότυπου λόγω της διαγραφής του Xist στα ποντίκια, περισσότερο ανησυχητικό θα είναι το ενδεχόμενο το Xist αρνητικών γραμμών hiPSC να

προκαλέσει καρκίνο όταν εισάγεται *in vivo* σε κλινικό περιβάλλον. Μάλιστα τα hiPSC της τάξης III έδειξαν επίσης μερική X επανενεργοποίηση, γρηγορότερους χρόνους διπλασιασμού, και μία ξεχωριστή υπογραφή έκφρασης γονιδίων των καρκινικών κυττάρων, ζητώντας περαιτέρω προσεκτική πραγματοποίηση πριν τη χρήση των hiPSC στην αναγεννητική ιατρική.

Η γενωμική αποτύπωση επίσης συμβάλλει στην ποιότητα των iPSC στον άνθρωπο και στα ποντίκια. Η αποτυπωμένη κατάσταση της αποτυπωμένης Dlk1-Dio3 περιοχής – ιδίως η έκφραση του Gtl2 (aka Meg3) lncRNA – έχει βρεθεί στο επίκεντρο της προσοχής. Μία μελέτη έδειξε ότι οι κλώνοι iPSC ποντικού με ανώμαλη αποτύπωση της Dlk1-Dio3 και η χαμηλή έκφραση του Gtl2 συμβάλλουν ελάχιστα στις χίμαιρες (Stadtfield et al, 2010), ενώ κάποιος άλλος δεν παρατήρησε καμία διαφορά (Carey et al, 2011). Υπάρχει, ωστόσο, γενική συμφωνία ότι η απώλεια της αποτύπωσης στη θέση αυτή είχε ως αποτέλεσμα χαμηλότερη απόδοση στη δημιουργία εξ ολοκλήρου iPSC – που προέρχονται από ποντικούς. Με περαιτέρω έρευνα, είναι πιθανό ότι και άλλοι τόποι αποτύπωσης θα επηρεάζουν την ποιότητα των βλαστικών κυττάρων. Παρ' όλα αυτά, παρά τον αριθμό των ισχυρισμών ότι η αποτύπωση είναι παράδοξη, τα iPSCs μπορεί να αποτελέσουν σημαντικό εργαλείο για τη μελέτη διαταραχών αποτύπωσης σε δυσπρόσιτους κυτταρικούς τύπους, όπως οι νευρώνες στο AS (Chamberlain et al, 2010).

Πίνακας 1. Περίληψη των lncRNAs και προτεινόμενες πρωτεΐνες-συνεργάτες που αλληλεπιδρούν για την αδρανοποίηση του X χρωμοσώματος.

RNA	Λειτουργία	Cis- or trans-δράση	Γνωστές πρωτεΐνες αλληλεπίδρασης
Xist	Απαιτείται για την έναρξη της X-αδρανοποίησης	cis, μπορεί σε μερικές περιπτώσεις να δρα in trans σε αυτοσωμικά Xist διαγονίδια	PRC2 , YY1 , hnRNP-U , ASF
Tsix	Καταστέλλει την έκφραση του Xist μέσω της αποσιώπησης του υποκινητή του Xist , επίσης απαιτείται για το ζευγάρι των X-χρωμοσωμάτων, Μετράει τον αριθμό των XICs, και επιλέγει την αλληλοαναίρεση των αλληλίων	cis	Dnmt3a
RepA	Ανεξάρτητο μεταγράφημα από τοXist 5'άκρο, Βοηθάει την ενεργοποίηση του Xist	cis	PRC2
Jpx	Ενεργοποιεί την Xist μεταγραφή, μετράει τα X χρωμοσώματα	trans (μέτρια cis προτίμηση)	CTCF
Ftx	Δυνητικός ενεργοποιητής της έκφρασης του Xist	Άγνωστη	Άγνωστες
(Froberg et al, 2013)			

4.4 HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA)

Μελέτες στην αποζημίωση της δοσολογίας, αποτύπωση και ομοιοτική έκφραση γονιδίων δείχνουν ότι τα lincRNAs μπορούν να λειτουργήσουν ως σημείο επαφής μεταξύ του DNA και των ειδικών δραστηριοτήτων αναδιαμόρφωσης της χρωματίνης. Τα lincRNAs στους HOX τόπους απορυθμίζονται συστηματικά κατά τη διάρκεια της εξέλιξης του καρκίνου του μαστού. Το lincRNA HOTAIR αυξάνεται σε έκφραση στους πρωτογενείς όγκους του μαστού και στις μεταστάσεις, και επίσης, το επίπεδο έκφρασης του HOTAIR σε πρωτογενείς όγκους είναι ένας ισχυρός προγνωστικός παράγοντας της ενδεχόμενης μετάστασης και του θανάτου. Αναγκαστική έκφραση του HOTAIR στα επιθηλιακά κύτταρα του καρκίνου, η οποία προκαλείται από εκ νέου στόχευση των Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) στο γονιδίωμα, με ένα σχέδιο επικάλυψης που μοιάζει περισσότερο σε εμβρυικούς ινοβλάστες, με αποτέλεσμα να μεταβληθεί η μεθυλίωση της ιστόνης H3 και λυσίνης 27, η γονιδιακή έκφραση, και η αυξημένη ικανότητα εισβολής του καρκίνου, και η μετάσταση με τρόπο εξαρτώμενο από το PRC2. Αντιστρόφως, η απώλεια του HOTAIR μπορεί να αναστείλει την διεισδυτικότητα του καρκίνου, ιδιαίτερα σε κύτταρα που διαθέτουν υπερβολική δραστηριότητα του PRC2. Τα ευρήματα αυτά υποδηλώνουν ότι τα lincRNAs παίζουν ενεργό ρόλο στην διαμόρφωση του επιγονιδιώματος του καρκίνου και μπορεί να είναι σημαντικοί στόχοι για τη διάγνωση και θεραπεία του καρκίνου (Gupta et al, 2010).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 : ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΚΑΡΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΠΟΙΑ Η ΣΧΕΣΗ ΤΟΥ ΜΕ ΤΑ LncRNAs

5.1 ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΣΗΜΑΤΟΔΟΤΗΣΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Ένα από τα εξέχοντα χαρακτηριστικά του καρκινικού κυττάρου είναι η ικανότητά του να πολλαπλασιάζεται συνεχώς και με την απουσία εξωτερικών ερεθισμάτων. Τα φυσιολογικά κύτταρα διαχειρίζονται προσεκτικά την παραγωγή αυξητικών παραγόντων προώθησης ή καταστολής για να εξασφαλίσουν τον αυστηρό έλεγχο του αριθμού των κυττάρων, την αρχιτεκτονική των ιστών και την λειτουργία τους. Σε αντίθεση, τα καρκινικά κύτταρα εμφανίζουν απορυθμισμένους καταρράκτες σηματοδότησης που τους επιτρέπουν να είναι περισσότερο ή λιγότερο ανεξάρτητα από την σηματοδότηση πολλαπλασιασμού, το οποίο οδηγεί σε ασταμάτητη ανάπτυξη. Για να επιτευχθεί αυτή η ανεξαρτησία, τα καρκινικά κύτταρα απέκτησαν την ικανότητα να διατηρούν τις πολλαπλασιαστικές τους ικανότητες με διάφορους τρόπους: (1) παράγουν δικούς τους αυξητικούς παράγοντες και τα αντίστοιχα μόρια δέκτες με αποτέλεσμα την αυτοκρινή διέγερση, (2) μπορεί επίσης να παράγουν παρακρινή σήματα για την τόνωση των κυττάρων που σχετίζονται με τον όγκο (στρώματος του όγκου), τα οποία με τη σειρά τους παράγουν διάφορους αυξητικούς παράγοντες για τη στήριξη των καρκινικών κυττάρων, (3) επιπλέον, τα επίπεδα των αυξητικών παραγόντων θα μπορούσαν να είναι αυξημένα ή ο υποδοχέας σηματοδότησης θα μπορούσε να μεταβληθεί, καθιστώντας τα καρκινικά κύτταρα υπεραποκρίσιμα, (4) τελευταίο αλλά όχι λιγότερο σημαντικό, τα καρκινικά κύτταρα μπορούν να γίνουν εντελώς ανεξάρτητα από εξωγενείς αυξητικούς παράγοντες.

Και εδώ έρχεται η ερώτηση: Ποιους ρόλους παίζουν εδώ τα lncRNAs; Μία πρώτη απάντηση σε αυτό προκύπτει από ορμονική σηματοδότηση, ειδικά η σηματοδότηση στεροειδών ορμονών στα δύο φύλα. Τα οιστρογόνα, η προγεστερόνη και τα ανδρογόνα, είναι γνωστές ορμόνες που στοχεύουν τους

μαστικούς αδένες, ωοθήκες και μήτρα στα θηλυκά ή τους όρχεις και τον προστατικό αδένα στα αρσενικά. Η δράση τους πραγματοποιείται σε αυτούς τους ιστούς μέσω της ειδικής αλληλεπίδρασης με τους ενδοκυτταρικούς τους υποδοχείς, τον υποδοχέα οιστρογόνων (ER), τον υποδοχέα της προγεστερόνης (PR) και του υποδοχέα των ανδρογόνων (AR). Αυτό ρυθμίζει την έκφραση του γονιδίου στόχου, καθώς αυτοί οι υποδοχείς λειτουργούν σαν μεταγραφικοί παράγοντες και η μη φυσιολογική έκφραση ή λειτουργία αυτών των υποδοχέων έχει ενοχοποιηθεί σε όγκους των αναπαραγωγικών οργάνων και στα δύο φύλα. Όπως και σε πολλούς άλλους μεταγραφικούς παράγοντες, η δραστηριότητα αυτών των υποδοχέων επηρεάζεται από πρόσθετους παράγοντες, τους λεγόμενους συνενεργοποιητές ή συνκαταστολείς. Καθώς οι συνενεργοποιητές ενισχύουν τη μεταγραφική δραστηριότητα, οι συνκαταστολείς μπλοκάρουν τη δράση τους με αποτέλεσμα μία περίπλοκη αλληλεπίδραση της έκφρασης των υποκείμενων συντονισμένων γονιδίων. Οι αλλαγές στο επίπεδο έκφρασης ή στο μοτίβο αυτών των συνενεργοποιητών και συνκαταστολέων μπορούν να επηρεάσουν τη μεταγραφική δραστηριότητα των στεροειδών ορμονών και στη συνέχεια να προκαλέσουν διαταραχές στους ιστούς στόχους (Lonard & O'Malley, 2005)

5.2 ΑΠΟΦΥΓΗ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΤΑΣΤΟΛΕΩΝ

Μία εξαιρετικά συμπληρωματική ικανότητα για τη διατήρηση της πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης στα καρκινικά κύτταρα, είναι η αποφυγή ανάπτυξης καταστολέων. Έχουν ανακαλυφθεί αρκετά κατασταλτικά γονίδια που κωδικοποιούν πρωτεΐνες τα οποία λειτουργούν με διάφορους τρόπους για να αναστείλουν την κυτταρική ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό, π.χ Trp53, PTEN ή RB. Η ενεργοποίηση αυτών των ογκοκατασταλτικών γονιδίων εξαρτάται από εξαρτάται από εξωτερικά ή εσωτερικά ερεθίσματα και μπορεί είτε να διακόψει τον κυτταρικό κύκλο ή να προκαλέσει γήρανση και την απόπτωση. Ως εκ τούτου, τα καρκινικά κύτταρα πρέπει να βρουν ένα τρόπο για να αποτρέψουν την ενεργοποίηση ή την έκφρασή τους. Ένας μηχανισμός με τον οποίο τα καρκινικά

κύτταρα ασχολούνται με αυτό είναι η πλήρης απώλεια του γονιδίου καταστολής του όγκου ή τη συσσώρευση μεταλλάξεων που καθιστούν αυτό το γονίδιο ανενεργό. Στην πραγματικότητα, το 50% των ανθρώπινων όγκων περιέχουν μία μετάλλαξη ή διαγραφή του γονιδίου Trp53 και οι άνθρωποι που κληρονόμησαν μόνο ένα λειτουργικό αντίγραφο του γονιδίου Trp53 θα αναπτύξουν πιθανότατα όγκο στην πρώιμη ενήλικη ζωή, μία ασθένεια γνωστή ως σύνδρομο Li-Fraumeni. Εναλλακτικά, ογκοκατασταλτικά γονίδια θα μπορούσαν να προσδεθούν σε άλλες πρωτεΐνες που εκφράζονται σε κύτταρα όγκου, με αποτέλεσμα να απενεργοποιηθεί ή να υποβαθμιστεί γρήγορα. Ένα τέτοιο παράδειγμα δίνεται από τον ιό των ανθρώπινων θηλωμάτων (HPV) με τα ογκογονίδια E6 και E7, τα οποία εκφράζονται κατά προτίμηση σε καρκίνο του τραχήλου της μήτρας. Αυτά αλληλεπιδρούν με το Trp53 και RB, τα οποία οδηγούν στην απενεργοποίησή τους.

Ένας εντελώς διαφορετικός τρόπος δράσης εκτελείται από το lncRNA ANRIL (ένα antisense lncRNA στην περιοχή INK4) για να μπλοκάρει την δράση των ογκοκατασταλτικών γονιδίων στον όγκο. Αντί να ανταγωνίζεται με το DNA για την πρόσδεση με την πρωτεΐνη καταστολέα, το ANRIL αλληλεπιδρά με το SUZ12 (suppressor of zeste 12 homolog), μία υπομονάδα του συμπλόκου καταστολής του PRC2, και στρατολογεί το σύμπλοκο για την καταστολή της έκφρασης του p15 (INK4B), ένα πολύ γνωστό ογκοκατασταλτικό γονίδιο. Επιπλέον, η μείωση του ANRIL αυξάνει την έκφραση του p15 και αναστέλλει τον κυτταρικό πολλαπλασιασμό.

Εκτός από αυτές τις ογκογονικές λειτουργίες των lncRNAs, τους έχουν ανατεθεί και λειτουργίες ογκοκατασταλτικών. Ένα πολύ γνωστό παράδειγμα είναι το ncRNA GAS5 (Growth Arrest-Specific 5). Αρχικά, προσδιορίζεται με βάση την αύξηση των επιπέδων στην παύση ανάπτυξης της ινοβλάστης NIH3T3. Σε αντίθεση, η έκφραση του GAS5 είναι έντονα μειωμένη σε ενεργώς αναπτυσσόμενα κύτταρα λευχαιμίας ή κύτταρα NIH3T3 και με τη σειρά του αυξάνει την πυκνότητά του μετά από επαγόμενη παύση του κυτταρικού κύκλου. Το ανθρώπινο γονίδιο GAS5 μεταγράφεται από το χρωμόσωμα 1q25. Τα εξόνια

του περιέχουν ένα μικρό και κακώς συντηρημένο ανοιχτό πλαίσιο ανάγνωσης και δεν κωδικοποιεί καμία λειτουργική πρωτεΐνη. Λειτουργεί ως «ριβοκαταστολέας» και επίσης είναι ενδιαφέρον το γεγονός ότι το μονοπάτι mTOR εξαρτάται από το GAS5. Το μονοπάτι mTOR διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής ανάπτυξης και ρυθμίζει τη σύνθεση της κυτταρικής πρωτεΐνης και του πολλαπλασιασμού. Η ελάττωση του GAS5 από την παρεμβολή του RNA προστατεύει τόσο τα λευχαιμικά όσο και τα πρωτογενή ανθρώπινα Τα κύτταρα από την αντι-πολλαπλασιαστική επίδραση της ραπαμικύνης, γεγονός που υποδηλώνει ότι το GAS5 απαιτείται άμεσα ή έμμεσα. Πως μπορούν τα καρκινικά κύτταρα να το αντιμετωπίσουν με αυτό το ογκοκατασταλτικό ncRNA; Στον καρκίνο του μαστού, το GAS5 δείχνει μία σημαντικά χαμηλότερη έκφραση σε σύγκριση με τους επιθηλιακούς ιστούς του κανονικού μαστού. Επιπλέον, γενετικές εκτροπές των GAS5 τόπων έχουν βρεθεί σε πολλούς τύπους όγκων, συμπεριλαμβανομένων του μελανώματος, του καρκίνου του μαστού και του προστάτη αλλά η λειτουργική τους σημασία δεν έχει ακόμη ακριβώς καθοριστεί.

5.3 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΑΘΑΝΑΣΙΑΣ

Σύμφωνα με τα πρώτα δύο χαρακτηριστικά του καρκίνου τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα με τον πολλαπλασιασμό, αυτό είναι το τρίτο γνώρισμα του καρκίνου: η απεριόριστη δύναμη αντιγραφής. Σε αντίθεση με τα κανονικά κύτταρα που είναι σε θέση να περάσουν μέσα από ένα περιορισμένο αριθμό κύκλων της κυτταρικής διαίρεσης, τα καρκινικά κύτταρα παρουσιάζουν σχεδόν απεριόριστη αντιγραφή. Το χρωμόσωμα τελειώνει, τα τελομερή είναι ζωτικής σημασίας γι' αυτό το όριο αντιγραφής. Στα σπονδυλωτά, αυτές οι αλληλουχίες αποτελούνται από επαναλήψεις του εξανουκλεοτιδίου "TTA GGG" και προστατεύουν τα άκρα των χρωμοσωμάτων. Ωστόσο, στα φυσιολογικά κύτταρα, αυτές οι επαναλήψεις συντομεύουν μετά από κάθε κυτταρική διαίρεση και επομένως το μήκος του τελομερικού DNA υπαγορεύει τον αριθμό των κύκλων της κυτταρικής διαίρεσης. Η απώλεια αυτών των προστατευτικών άκρων οδηγεί τελικά στην κρίση. Τα κύτταρα των όγκων έχουν βρει δύο τρόπους να

παρακάμψουν την απώλεια των τελομερών: (1) περίπου το 90% όλων των ανθρώπινων καρκίνων εκφράζουν ένα εξειδικευμένο ένζυμο, που ονομάζεται τελομεράση, το οποίο είναι σε θέση να προσθέσει τελομερικές επαναλήψεις στο τέλος των χρωμοσωμάτων. (2) το υπόλοιπο 10% του συνόλου των κυττάρων στους όγκους ασχολείται με την εναλλακτική επιμήκυνση των τελομερών (ALT), μία μη συντηρητική οδός επιμήκυνσης των τελομερών η οποία περιλαμβάνει τη μεταφορά επαναλήψεων τελομερών παράλληλα μεταξύ των αδελφών χρωματίδων. Είναι ενδιαφέρον ότι το κύριο μονοπάτι που περιλαμβάνει η τελομεράση εξαρτάται από ένα ncRNA. Το ολοένζυμο της τελομεράσης αποτελείται από ένα πρωτεϊνικό συστατικό, μία αντίστροφη μεταγραφάση που ονομάζεται TERT (Telomerase Reverse Transcriptase) και έναν RNA εκκινητή επίσης γνωστό ως TERC (Telomerase RNA Component) ή TR (Telomerase RNA). Το TERC δεν είναι το μόνο RNA που σχετίζεται με τα τελομερή. Έχει ανακαλυφθεί και μία ομάδα από lncRNA που ονομάζεται TERRA (telomeric repeat-containing RNA).

5.4 ΕΝΕΡΓΟΠΟΙΗΣΗ ΕΙΣΒΟΛΗΣ ΚΑΙ ΜΕΤΑΣΤΑΣΗ

Το τέταρτο χαρακτηριστικό είναι η ικανότητα να εισβάλλουν και να σχηματίζουν απομακρυσμένες μεταστάσεις, το οποίο είναι άκρως προκλητικό και από πίσω κρύβεται μία πληθώρα πολύπλοκων αλληλεπιδράσεων και ρυθμιστικών μηχανισμών. Έχει ανακαλυφθεί ένα lncRNA, το MALAT1 (Metastasis-Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1, MALAT-1) και αργότερα αναφέρεται ως NEAT2 (Nuclear-Enriched Abundant Transcript 2) ως προγνωστικός δείκτης για τη μετάσταση και την επιβίωση των ασθενών σε μη-μικροκυτταρικό καρκίνο του πνεύμονα (NSCLC). Αυτό το lncRNA έχει εξαιρετική αφθονία σε πολλούς τύπους ανθρώπινων κυττάρων και είναι εξαιρετικά διατηρημένο σε διάφορα είδη υπογραμμίζοντας τη λειτουργική σημασία του. Ένα δεύτερο lncRNA που συμμετέχει στη μετάσταση του καρκίνου είναι το HOTAIR (HOX Antisense Intergenic RNA).

5.5 ΠΡΟΚΛΗΣΗ ΑΓΓΕΙΟΓΕΝΕΣΗΣ

Όταν τα καρκινικά κύτταρα αναπτύσσονται και πολλαπλασιάζονται, αυξάνει η μάζα και το μέγεθος του όγκου. Η διαδικασία αυτή θα πρέπει να περιορίζεται από την οριακή φυσική διάχυση οξυγόνου και θρεπτικών συστατικών, εάν τα κύτταρα του όγκου δεν αποκτήσουν το πέμπτο χαρακτηριστικό: την ικανότητα να επάγουν αγγειογένεση. Ο σχηματισμός νέων αιμοφόρων αγγείων, που προκαλείται από τα κύτταρα του όγκου, εξασφαλίζει όχι μόνο την παροχή με θρεπτικά συστατικά και οξυγόνο, αλλά επιτρέπει στους όγκους να απορρίψουν τα μεταβολικά τους απόβλητα και να εισάγουν την αιματογενή μεταστατική διαδικασία. Οι διεργασίες της αγγειογένεσης συνήθως περιορίζονται στην εμβρυϊκή ανάπτυξη, αλλά μπορεί να γίνει εκ νέου και ενεργοποιείται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες σε ενήλικες.

Το αHIF, ένα φυσικό antisense μετάγραφου (NAT) συμπληρωματικό με την 3' αμετάφραστη περιοχή της υποξίας ενός επαγωγίμου παράγοντα (HIF1α), ρυθμίζει αρνητικά την έκφραση του HIF1α, ένας κρίσιμος ρυθμιστής της αγγειογένεσης. Υπερέκφραση του αHIF πυροδοτεί την αποσύνθεση του HIF1α mRNA. αHIF μεταγραφές μπορούν να ανιχνευθούν σε πολλούς ανθρώπινους ιστούς και καρκίνους και είναι ένας δείκτης για φτωχή πρόγνωση σε καρκίνο του μαστού. (Gutschner & Diederichs, 2012).

Cancer Hallmark	LncRNA	Mode of action
I. Διατήρηση πολλαπλασιαστικής σηματοδότησης	SRA	Μεταγραφικός Συν- ενεργοποιητής
	PCAT-1	Ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση
	RN7SK	Ρυθμίζει τη μεταγραφή
	ncRNAs προερχόμενα από υποκινητές γονιδίων του κυτταρικού κύκλου	Άγνωστη δράση
	KRAS P1	Σφουγγάρι mRNA
	PR antisense	Ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση
II. Αποφεύγοντας καταστολές ανάπτυξης	PSF-αλληλεπίδραση με RNA	Ρυθμίζει τη δραστηκότητα της πρωτεΐνης
	ANRIL	Αναδιαμόρφωση της χρωματίνης
	GAS5	Ανταγωνιστής
	lincRNA-p21	Μεταγραφικός συν-καταστολέας
	E2F4 antisense	Ρυθμίζει τη γονιδιακή έκφραση
III. Ενεργοποίηση αντιγραφικής αθανασίας	TERC	RNA εκκινητής
	TERRA	Ενζυματικός αναστολέας
IV. Ενεργοποίηση εισβολής και μετάσταση	MALAT1	Ρυθμιστής δραστηκότητας πρωτεΐνης, αισθητήρας, ικρίωμα

V. Πρόκληση αγγειογένεσης	HOTAIR	Αναδιαμόρφωση χρωματίνης
	HULC BC200	Σφουγγάρι miRNA Μεταγραφικός ρυθμιστής
	α HIF	Αποσύνθεση RNA
	sONE/NOS3AS	Αποσύνθεση RNA
	tie-1AS	Αποσύνθεση RNA
	ncR-uPAR	Ρυθμιστής γονιδιακής έκφρασης
VI. Αντίσταση στον κυτταρικό θάνατο	PCGEM1	Ρυθμιστής γονιδιακής έκφρασης
	CUDR	Ρυθμιστής γονιδιακής έκφρασης
	uc.73A(P)	Άγνωστο
	SPRY4-IT1	Άγνωστο
	PANDA	Ρυθμιστής δραστηκότητας πρωτεΐνης
	LUST PINC	RNA-Μάτισμα Άγνωστο

(Gutschner & Diederichs, 2012)

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Έχει γίνει σαφές ότι τα lncRNAs μπορούν να έχουν πολυάριθμες μοριακές λειτουργίες, συμπεριλαμβανομένης της διαμόρφωσης των μεταγραφικών προτύπων, τη ρύθμιση των δραστηριοτήτων των πρωτεϊνών, εξυπηρετούν του διαρθρωτικούς ή οργανωτικούς ρόλους, αλλάζοντας την επεξεργασία των RNA γεγονότων, και χρησιμεύουν σαν πρόδρομες ουσίες στα small ncRNAs. Αν και ένα πολύ μικρό τμήμα των γνωστών lncRNAs έχει χαρακτηριστεί πλήρως μέχρι σήμερα, η μελλοντική έρευνα πιθανότατα να προσδιορίσει πολλά περισσότερα μεταγραφήματα που ταιριάζουν στα ήδη υπάρχοντα και άλλα λειτουργικά παραδείγματα. Επιπλέον, η μελλοντική έρευνα θα ασχοληθεί περαιτέρω με το ζήτημα του κατά πόσον η μεταγραφική πράξη των ncRNAs είναι αρκετή για να έχουμε λειτουργικές συνέπειες, ή αν πολλά από τα ncRNAs που προκύπτουν έχουν πραγματική λειτουργικότητα *in cis*, τα οποία δεν μπορούν να ανακεφαλαιωθούν από έκτοπη έκφραση *in trans*.

Η προηγούμενη συζήτηση παρέχει μια προεπισκόπηση της παρούσας κατάστασης των γνώσεων σχετικά με τις θέσεις, τις λειτουργίες και τους μηχανισμούς των lncRNAs. Ένα μεγάλο κλάσμα του γονιδιώματος σε πολλούς οργανισμούς μεταγράφεται, αλλά τα χαρακτηριστικά και οι λειτουργίες στην συντριπτική πλειοψηφία αυτών των lncRNAs επί του παρόντος δεν είναι γνωστά. Μερικά είναι πυρηνικά, μερικά κυτοπλασματικά, μερικά έχουν υψηλή έκφραση, κάποια ανιχνεύονται ελάχιστα. Στο τέλος, μπορεί να μην είναι εφικτό ή αντιληπτό να προσπαθήσουμε να εφαρμόσουμε κριτήρια όπως η σταθερότητα, η διατήρηση και το επίπεδο έκφρασης για να βρεθεί μία τάξη σε αυτό το χάος. Με υψηλό κύκλο, κακώς συντηρημένες και με χαμηλής αφθονίας μεταγραφές, θα μπορούσαν ακόμη και έτσι να έχουν βασικές λειτουργίες. Για παράδειγμα, το Kcnq1ot1 έχει χρόνο ημιζωής 1 ώρα (Clark et al, 2012), τα lncRNAs στο Xic έχουν βρεθεί μόνο στον πλακούντα των θηλαστικών και έχουν χαμηλή διατήρηση ακόμη και σε αυτή την ομάδα ταξινόμησης, και επίσης το RepA υπάρχει σε 5-10 αντίγραφα σε κάθε κύτταρο. Ωστόσο, ακόμη και πλήρης επεξεργασίας

μεταγραφήματα που αλληλεπιδρούν με παράγοντες πρωτεΐνης μπορεί να μην είναι απαραίτητοι.

Εξακολουθούν να υπάρχουν τεράστια κενά στην κατανόηση των lncRNAs, συμπεριλαμβανομένης της αναλογίας της λειτουργικότητάς του και του εύρους της μηχανιστικής βάσης των καθκόντων τους. Αυτό που απαιτείται και αναπτύσσεται στην παρούσα χρονική περίοδο, είναι η εφαρμογή των τεχνικών του γονιδιώματος σε ολόκληρο επίπεδο που αποκαλύπτουν την πλήρη έκταση της έκφρασης των ncRNAs. Αμερόληπτες τεχνικές όπως η αλληλούχιση νέας γενιάς, οι οποίες έχουν το πλεονέκτημα του να μην περιορίζονται από τους σχολιασμούς της κεντρικής πρωτεΐνης. Τα δεδομένα αυτά θα κατασκευάσουν σταδιακά έναν κατάλογο με ncRNAs με κοινά χαρακτηριστικά που θα βοηθήσουν στην ταυτοποίηση και την πρόβλεψη των λειτουργικών χαρακτηριστικών, ο οποίος θα συμπληρώνεται από πειραματικές αναλύσεις μεμονωμένων παραδειγμάτων για τον προσδιορισμό των μηχανισμών με τους οποίους δρουν τα ncRNAs. Αυτό θα περιλαμβάνει όλο και περισσότερο τη διασταύρωση τεχνικών από άλλους τομείς, όπως απεικόνιση του RNA σε ζωντανό κύτταρο, RNA πρωτεωμική (δηλαδή η ανάλυση του RNA που σχετίζεται με πρωτεϊνικά σύμπλοκα) και τη βιολογία της δομής του RNA. Τα lncRNAs έχουν τη δυνατότητα να ανταγωνίζονται το λειτουργικό ρεπερτόριο του συνόλου των πρωτεϊνών, αν και με τη χρήση διαφορετικού φάσματος. Είναι ήδη προφανές ότι οποιαδήποτε RNA, ανεξάρτητα της ικανότητας κωδικοποίησης πρωτεΐνης, μπορεί να έχει τα δικά του εγγενή μηνύματα να παραδώσει, γεγονός που υποδηλώνει ότι το γονιδίωμα μπορεί να περιλαμβάνει μία σουίτα βασισμένη στις πληροφορίες των RNA, το οποίο είναι πιο περίπλοκο απ' ό,τι αναμενόταν. Σε περίπτωση που αποδειχθεί ότι στην πλειοψηφία τους τα RNA είναι λειτουργικά, αυτός ο χαρακτηρισμός θα έχει σημαντικό αντίκτυπο στην κατανόηση του γενετικού προγραμματισμού του συμπλόκου των οργανισμών, και θα φέρει απαντήσεις σε παλιά ερωτήματα που βρίσκονται ακόμη σε εξέλιξη, την ανάπτυξη και την κατανόηση της νόσου.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Agarwal A, Koppstein D, Rozowsky J, Sboner A, Habegger L, Hillier LW, Sasidharan R, Reinke V, Waterston RH, Gerstein M (2010) Comparison and calibration of transcriptome data from RNA-Seq and tiling arrays. *Bmc Genomics* **11**: 383

Amaral PP, Neyt C, Wilkins SJ, Askarian-Amiri ME, Sunkin SM, Perkins AC, Mattick JS (2009) Complex architecture and regulated expression of the Sox2ot locus during vertebrate development. *RNA* **15**: 2013-2027

Ayoubi TA, Van De Ven WJ (1996) Regulation of gene expression by alternative promoters. *FASEB J* **10**: 453-460

Azzalin CM, Reichenbach P, Khoriauli L, Giulotto E, Lingner J (2007) Telomeric repeat containing RNA and RNA surveillance factors at mammalian chromosome ends. *Science* **318**: 798-801

Bejerano G, Pheasant M, Makunin I, Stephen S, Kent WJ, Mattick JS, Haussler D (2004) Ultraconserved elements in the human genome. *Science* **304**: 1321-1325

Beltran M, Puig I, Pena C, Garcia JM, Alvarez AB, Pena R, Bonilla F, de Herreros AG (2008) A natural antisense transcript regulates Zeb2/Sip1 gene expression during Snail1-induced epithelial-mesenchymal transition. *Genes Dev* **22**: 756-769

Berget SM, Moore C, Sharp PA (1977) Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* **74**: 3171-3175

Bernard D, Prasanth KV, Tripathi V, Colasse S, Nakamura T, Xuan Z, Zhang MQ, Sedel F, Jourdain L, Couplier F, Triller A, Spector DL, Bessis A (2010) A long nuclear-retained non-coding RNA regulates synaptogenesis by modulating gene expression. *EMBO J* **29**: 3082-3093

Bernstein BE, Birney E, Dunham I, Green ED, Gunter C, Snyder M (2012) An integrated encyclopedia of DNA elements in the human genome. *Nature* **489**: 57-74

Bertone P, Stolc V, Royce TE, Rozowsky JS, Urban AE, Zhu X, Rinn JL, Tongprasit W, Samanta M, Weissman S, Gerstein M, Snyder M (2004) Global identification of human transcribed sequences with genome tiling arrays. *Science* **306**: 2242-2246

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigó R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE (2007a) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**: 799-816

Birney E, Stamatoyannopoulos JA, Dutta A, Guigo R, Gingeras TR, Margulies EH, Weng Z, Snyder M, Dermitzakis ET, Thurman RE, Kuehn MS, Taylor CM, Neph S, Koch CM, Asthana S, Malhotra A, Adzhubei I, Greenbaum JA, Andrews RM, Flicek P, Boyle PJ, Cao H, Carter NP, Clelland GK, Davis S, Day N, Dhami P, Dillon SC, Dorschner MO, Fiegler H, Giresi PG, Goldy J, Hawrylycz M, Haydock A, Humbert R, James KD, Johnson BE, Johnson EM, Frum TT, Rosenzweig ER, Karnani N, Lee K, Lefebvre GC, Navas PA, Neri F, Parker SC, Sabo PJ, Sandstrom R, Shafer A, Vetrie D, Weaver M, Wilcox S, Yu M, Collins FS, Dekker J, Lieb JD, Tullius TD, Crawford GE, Sunyaev S, Noble WS, Dunham I, Denoeud F, Reymond A, Kapranov P, Rozowsky J, Zheng D, Castelo R, Frankish A, Harrow J, Ghosh S, Sandelin A, Hofacker IL, Baertsch R, Keefe D, Dike S, Cheng J, Hirsch HA, Sekinger EA, Lagarde J, Abril JF, Shahab A, Flamm C, Fried C, Hackermuller J, Hertel J, Lindemeyer M, Missal K, Tanzer A, Washietl S, Korb J, Emanuelsson O, Pedersen JS, Holroyd N, Taylor R, Swarbreck D, Matthews N, Dickson MC, Thomas DJ, Weirauch MT, Gilbert J, Drenkow J, Bell I, Zhao X, Srinivasan KG, Sung WK, Ooi HS, Chiu KP, Foissac S, Alioto T, Brent M, Pachter L, Tress ML, Valencia A, Choo SW, Choo CY, Ucla C, Manzano C, Wyss C, Cheung E, Clark TG, Brown JB, Ganesh M, Patel S, Tammanna H, Chrast J, Henrichsen CN, Kai C, Kawai J, Nagalakshmi U, Wu J, Lian Z, Lian J, Newburger P, Zhang X, Bickel P, Mattick JS, Carninci P, Hayashizaki Y, Weissman S, Hubbard T, Myers RM, Rogers J, Stadler PF, Lowe TM, Wei CL, Ruan Y, Struhl K, Gerstein M, Antonarakis SE, Fu Y, Green ED, Karaoz U, Siepel A, Taylor J, Liefer LA, Wetterstrand KA, Good PJ, Feingold EA, Guyer MS, Cooper GM, Asimenos G, Dewey CN, Hou M, Nikolaev S, Montoya-Burgos JI, Loytynoja A, Whelan S, Pardi F, Massingham T, Huang H, Zhang NR, Holmes I, Mullikin JC, Ureta-Vidal A, Paten B, Seringhaus M, Church D, Rosenbloom K, Kent WJ, Stone EA, Batzoglou S, Goldman N, Hardison RC, Haussler D, Miller W, Sidow A, Trinklein ND, Zhang ZD, Barrera L, Stuart R, King DC, Ameur A, Enroth S, Bieda MC, Kim J, Bhinge AA, Jiang N, Liu J, Yao F, Vega VB, Lee CW, Ng P, Yang A, Moqtaderi Z, Zhu Z, Xu X, Squazzo S, Oberley

MJ, Inman D, Singer MA, Richmond TA, Munn KJ, Rada-Iglesias A, Wallerman O, Komorowski J, Fowler JC, Couttet P, Bruce AW, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Nix DA, Euskirchen G, Hartman S, Urban AE, Kraus P, Van Calcar S, Heintzman N, Kim TH, Wang K, Qu C, Hon G, Luna R, Glass CK, Rosenfeld MG, Aldred SF, Cooper SJ, Halees A, Lin JM, Shulha HP, Xu M, Haidar JN, Yu Y, Iyer VR, Green RD, Wadelius C, Farnham PJ, Ren B, Harte RA, Hinrichs AS, Trumbower H, Clawson H, Hillman-Jackson J, Zweig AS, Smith K, Thakkapallayil A, Barber G, Kuhn RM, Karolchik D, Armengol L, Bird CP, de Bakker PI, Kern AD, Lopez-Bigas N, Martin JD, Stranger BE, Woodroffe A, Davydov E, Dimas A, Eyraas E, Hallgrimsdottir IB, Huppert J, Zody MC, Abecasis GR, Estivill X, Bouffard GG, Guan X, Hansen NF, Idol JR, Maduro VV, Maskeri B, McDowell JC, Park M, Thomas PJ, Young AC, Blakesley RW, Muzny DM, Sodergren E, Wheeler DA, Worley KC, Jiang H, Weinstock GM, Gibbs RA, Graves T, Fulton R, Mardis ER, Wilson RK, Clamp M, Cuff J, Gnerre S, Jaffe DB, Chang JL, Lindblad-Toh K, Lander ES, Koriabine M, Nefedov M, Osoegawa K, Yoshinaga Y, Zhu B, de Jong PJ (2007b) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature* **447**: 799-816

Brannan CI, Dees EC, Ingram RS, Tilghman SM (1990) The product of the H19 gene may function as an RNA. *Molecular and cellular biology* **10**: 28-36

Britten RJ, Davidson EH (1969) Gene regulation for higher cells: a theory. *Science* **165**: 349-357

Britten RJ, Davidson EH (1971) Repetitive and non-repetitive DNA sequences and a speculation on the origins of evolutionary novelty. *Quarterly Review of Biology*: 111-138

Brockdorff N, Ashworth A, Kay GF, McCabe VM, Norris DP, Cooper PJ, Swift S, Rastan S (1992) The product of the mouse *Xist* gene is a 15 kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. *Cell* **71**: 515-526

Brown CJ, Hendrich BD, Rupert JL, Lafreniere RG, Xing Y, Lawrence J, Willard HF (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**: 527-542

Cabili MN, Trapnell C, Goff L, Koziol M, Tazon-Vega B, Regev A, Rinn JL (2011) Integrative annotation of human large intergenic noncoding RNAs reveals global properties and specific subclasses. *Genes Dev* **25**: 1915-1927

Calin GA, Croce CM (2006) MicroRNA signatures in human cancers. *Nat Rev Cancer* **6**: 857-866

Calin GA, Liu CG, Ferracin M, Hyslop T, Spizzo R, Sevignani C, Fabbri M, Cimmino A, Lee EJ, Wojcik SE, Shimizu M, Tili E, Rossi S, Taccioli C, Pichiorri F, Liu X, Zupo S, Herlea V, Gramantieri L, Lanza G, Alder H, Rassenti L, Volinia S, Schmittgen TD, Kipps TJ, Negrini M, Croce CM (2007) Ultraconserved regions encoding ncRNAs are altered in human leukemias and carcinomas. *Cancer Cell* **12**: 215-229

Carey BW, Markoulaki S, Hanna JH, Faddah DA, Buganim Y, Kim J, Ganz K, Steine EJ, Cassady JP, Creighton MP, Welstead GG, Gao Q, Jaenisch R (2011) Reprogramming factor stoichiometry influences the epigenetic state and biological properties of induced pluripotent stem cells. *Cell Stem Cell* **9**: 588-598

Carey VJ, Wang YG (2011) Working covariance model selection for generalized estimating equations. *Stat Med* **30**: 3117-3124

Carninci P, Kasukawa T, Katayama S, Gough J, Frith MC, Maeda N, Oyama R, Ravasi T, Lenhard B, Wells C, Kodzius R, Shimokawa K, Bajic VB, Brenner SE, Batalov S, Forrest AR, Zavolan M, Davis MJ, Wilming LG, Aidinis V, Allen JE, Ambesi-Impiombato A, Apweiler R, Aturaliya RN, Bailey TL, Bansal M, Baxter L, Beisel KW, Bersano T, Bono H, Chalk AM, Chiu KP, Choudhary V, Christoffels A, Clutterbuck DR, Crowe ML, Dalla E, Dalrymple BP, de Bono B, Della Gatta G, di Bernardo D, Down T, Engstrom P, Fagiolini M, Faulkner G, Fletcher CF, Fukushima T, Furuno M, Futaki S, Gariboldi M, Georgii-Hemming P, Gingeras TR, Gojobori T, Green RE, Gustincich S, Harbers M, Hayashi Y, Hensch TK, Hirokawa N, Hill D, Huminiecki L, Iacono M, Ikeo K, Iwama A, Ishikawa T, Jakt M, Kanapin A, Katoh M, Kawasaki Y, Kelso J, Kitamura H, Kitano H, Kollias G, Krishnan SP, Kruger A, Kummerfeld SK, Kurochkin IV, Lareau LF, Lazarevic D, Lipovich L, Liu J, Liuni S, McWilliam S, Madan Babu M, Madera M, Marchionni L, Matsuda H, Matsuzawa S, Miki H, Mignone F, Miyake S, Morris K, Mottagui-Tabar S, Mulder N, Nakano N, Nakauchi H, Ng P, Nilsson R, Nishiguchi S, Nishikawa S, Nori F, Ohara O, Okazaki Y, Orlando V, Pang KC, Pavan WJ, Pavesi G, Pesole G, Petrovsky N, Piazza S, Reed J, Reid JF, Ring BZ, Ringwald M, Rost B, Ruan Y, Salzberg SL, Sandelin A, Schneider C, Schonbach C, Sekiguchi K, Semple CA, Seno S, Sessa L, Sheng Y, Shibata Y, Shimada H, Shimada K, Silva D, Sinclair B, Sperling S, Stupka E, Sugiura K, Sultana R, Takenaka Y, Taki K, Tammoja K, Tan SL, Tang S, Taylor MS, Tegner J, Teichmann SA, Ueda HR, van Nimwegen E, Verardo R, Wei CL, Yagi K, Yamanishi H, Zabarovsky E, Zhu S, Zimmer A, Hide W, Bult C, Grimmond SM, Teasdale RD, Liu ET, Brusica V, Quackenbush J, Wahlestedt C, Mattick JS, Hume DA, Kai C, Sasaki D, Tomaru Y, Fukuda S, Kanamori-Katayama M,

Suzuki M, Aoki J, Arakawa T, Iida J, Imamura K, Itoh M, Kato T, Kawaji H, Kawagashira N, Kawashima T, Kojima M, Kondo S, Konno H, Nakano K, Ninomiya N, Nishio T, Okada M, Plessy C, Shibata K, Shiraki T, Suzuki S, Tagami M, Waki K, Watahiki A, Okamura-Oho Y, Suzuki H, Kawai J, Hayashizaki Y (2005) The transcriptional landscape of the mammalian genome. *Science* **309**: 1559-1563

Chamberlain SJ, Chen PF, Ng KY, Bourgois-Rocha F, Lemtiri-Chlieh F, Levine ES, Lalande M (2010) Induced pluripotent stem cell models of the genomic imprinting disorders Angelman and Prader-Willi syndromes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**: 17668-17673

Chen LL, Carmichael GG (2010) Long noncoding RNAs in mammalian cells: what, where, and why? *Wiley Interdiscip Rev RNA* **1**: 2-21

Chodroff RA, Goodstadt L, Sirey TM, Oliver PL, Davies KE, Green ED, Molnar Z, Ponting CP (2010) Long noncoding RNA genes: conservation of sequence and brain expression among diverse amniotes. *Genome Biol* **11**: R72

Chow LT, Gelinas RE, Broker TR, Roberts RJ (1977) An amazing sequence arrangement at the 5' ends of adenovirus 2 messenger RNA. *Cell* **12**: 1-8

Clark MB, Johnston RL, Inostroza-Ponta M, Fox AH, Fortini E, Moscato P, Dinger ME, Mattick JS (2012) Genome-wide analysis of long noncoding RNA stability. *Genome Res* **22**: 885-898

Clark MB, Mattick JS (2011) Long noncoding RNAs in cell biology. *Semin Cell Dev Biol* **22**: 366-376

Clemson CM, Hutchinson JN, Sara SA, Ensminger AW, Fox AH, Chess A, Lawrence JB (2009) An architectural role for a nuclear noncoding RNA: NEAT1 RNA is essential for the structure of paraspeckles. *Mol Cell* **33**: 717-726

Comings DE (1972) The structure and function of chromatin. *Adv Hum Genet* **3**: 237-431

David L, Huber W, Granovskaia M, Toedling J, Palm CJ, Bofkin L, Jones T, Davis RW, Steinmetz LM (2006) A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5320-5325

de Koning AJ, Gu W, Castoe TA, Batzer MA, Pollock DD (2011) Repetitive elements may comprise over two-thirds of the human genome. *PLoS genetics* **7**: e1002384

Dinger ME, Pang KC, Mercer TR, Mattick JS (2008) Differentiating protein-coding and noncoding RNA: challenges and ambiguities. *PLoS Comput Biol* **4**: e1000176

Djebali S, Davis CA, Merkel A, Dobin A, Lassmann T, Mortazavi A, Tanzer A, Lagarde J, Lin W, Schlesinger F (2012) Landscape of transcription in human cells. *Nature* **489**: 101-108

Elisaphenko EA, Kolesnikov NN, Shevchenko AI, Rogozin IB, Nesterova TB, Brockdorff N, Zakian SM (2008) A dual origin of the Xist gene from a protein-coding gene and a set of transposable elements. *PLoS One* **3**: e2521

Faghihi MA, Modarresi F, Khalil AM, Wood DE, Sahagan BG, Morgan TE, Finch CE, St Laurent G, 3rd, Kenny PJ, Wahlestedt C (2008) Expression of a noncoding RNA is elevated in Alzheimer's disease and drives rapid feed-forward regulation of beta-secretase. *Nat Med* **14**: 723-730

Feng J, Bi C, Clark BS, Mady R, Shah P, Kohtz JD (2006) The Evf-2 noncoding RNA is transcribed from the Dlx-5/6 ultraconserved region and functions as a Dlx-2 transcriptional coactivator. *Genes Dev* **20**: 1470-1484

Froberg JE, Yang L, Lee JT (2013) Guided by RNAs: X-inactivation as a model for lncRNA function. *J Mol Biol* **425**: 3698-3706

Fu X, Ravindranath L, Tran N, Petrovics G, Srivastava S (2006) Regulation of apoptosis by a prostate-specific and prostate cancer-associated noncoding gene, PCGEM1. *DNA Cell Biol* **25**: 135-141

Gall JG (1981) Chromosome structure and the C-value paradox. *J Cell Biol* **91**: 3s-14s

Gibb EA, Vucic EA, Enfield KS, Stewart GL, Lonergan KM, Kennett JY, Becker-Santos DD, MacAulay CE, Lam S, Brown CJ, Lam WL (2011) Human cancer long non-coding RNA transcriptomes. *PLoS One* **6**: e25915

Gomez JA, Wapinski OL, Yang YW, Bureau JF, Gopinath S, Monack DM, Chang HY, Brahic M, Kirkegaard K (2013) The NeST long ncRNA controls microbial susceptibility and epigenetic activation of the interferon-gamma locus. *Cell* **152**: 743-754

Gong C, Maquat LE (2011) lncRNAs transactivate STAU1-mediated mRNA decay by duplexing with 3' UTRs via Alu elements. *Nature* **470**: 284-288

Good MC, Zalatan JG, Lim WA (2011) Scaffold proteins: hubs for controlling the flow of cellular information. *Science* **332**: 680-686

Guenther MG, Levine SS, Boyer LA, Jaenisch R, Young RA (2007) A chromatin landmark and transcription initiation at most promoters in human cells. *Cell* **130**: 77-88

Guil S, Soler M, Portela A, Carrère J, Fonalleras E, Gómez A, Villanueva A, Esteller M (2012) Intronic RNAs mediate EZH2 regulation of epigenetic targets. *Nature structural & molecular biology* **19**: 664-670

Gupta RA, Shah N, Wang KC, Kim J, Horlings HM, Wong DJ, Tsai MC, Hung T, Argani P, Rinn JL, Wang Y, Brzoska P, Kong B, Li R, West RB, van de Vijver MJ, Sukumar S, Chang HY (2010) Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* **464**: 1071-1076

Gutschner T, Diederichs S (2012) The hallmarks of cancer: a long non-coding RNA point of view. *RNA Biol* **9**: 703-719

Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP (2009a) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**: 223-227

Guttman M, Amit I, Garber M, French C, Lin MF, Feldser D, Huarte M, Zuk O, Carey BW, Cassady JP, Cabili MN, Jaenisch R, Mikkelsen TS, Jacks T, Hacohen N, Bernstein BE, Kellis M, Regev A, Rinn JL, Lander ES (2009b) Chromatin signature reveals over a thousand highly conserved large non-coding RNAs in mammals. *Nature* **458**: 223-227

Guttman M, Donaghey J, Carey BW, Garber M, Grenier JK, Munson G, Young G, Lucas AB, Ach R, Bruhn L (2011) lincRNAs act in the circuitry controlling pluripotency and differentiation. *Nature* **477**: 295-300

Hasegawa Y, Brockdorff N, Kawano S, Tsutui K, Nakagawa S (2010) The matrix protein hnRNP U is required for chromosomal localization of Xist RNA. *Dev Cell* **19**: 469-476

He Y, Vogelstein B, Velculescu VE, Papadopoulos N, Kinzler KW (2008) The antisense transcriptomes of human cells. *Science* **322**: 1855-1857

Heo JB, Sung S (2011) Vernalization-mediated epigenetic silencing by a long intronic noncoding RNA. *Science* **331**: 76-79

Holmes DS, Mayfield JE, Sander G, Bonner J (1972) Chromosomal RNA: its properties. *Science* **177**: 72-74

Huarte M, Guttman M, Feldser D, Garber M, Koziol MJ, Kenzelmann-Broz D, Khalil AM, Zuk O, Amit I, Rabani M, Attardi LD, Regev A, Lander ES, Jacks T, Rinn JL (2010) A large intergenic noncoding RNA induced by p53 mediates global gene repression in the p53 response. *Cell* **142**: 409-419

Hung T, Chang HY (2010) Long noncoding RNA in genome regulation: prospects and mechanisms. *RNA Biol* **7**: 582-585

Hung T, Wang Y, Lin MF, Koegel AK, Kotake Y, Grant GD, Horlings HM, Shah N, Umbricht C, Wang P, Kong B, Langerod A, Borresen-Dale AL, Kim SK, van de Vijver M, Sukumar S, Whitfield ML, Kellis M, Xiong Y, Wong DJ, Chang HY (2011) Extensive and coordinated transcription of noncoding RNAs within cell-cycle promoters. *Nat Genet* **43**: 621-629

Hutchinson JN, Ensminger AW, Clemson CM, Lynch CR, Lawrence JB, Chess A (2007) A screen for nuclear transcripts identifies two linked noncoding RNAs associated with SC35 splicing domains. *BMC Genomics* **8**: 39

Hutzing R, Mrazek J, Vorwerk S, Huttenhofer A (2010) NcRNA-microchip analysis: a novel approach to identify differential expression of noncoding RNAs. *RNA Biol* **7**: 586-595

Jacob F, Monod J (1961) Genetic regulatory mechanisms in the synthesis of proteins. *Journal of molecular biology* **3**: 318-356

Ji P, Diederichs S, Wang W (2003) Böing S, Metzger R, Schneider PM, Tidow N, Brandt B, Buerger H, Bulk E, Thomas M, Berdel WE, Serve H, Müller-Tidow C. MALAT-1, a novel noncoding RNA, and thymosin beta4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* **22**: 8031-8041

Jia H, Osak M, Bogu GK, Stanton LW, Johnson R, Lipovich L (2010) Genome-wide computational identification and manual annotation of human long noncoding RNA genes. *RNA* **16**: 1478-1487

John B, Miklos G (1979) Functional aspects of satellite DNA and heterochromatin. *International review of cytology* **58**: 1

Kapranov P, Drenkow J, Cheng J, Long J, Helt G, Dike S, Gingeras TR (2005) Examples of the complex architecture of the human transcriptome revealed by RACE and high-density tiling arrays. *Genome Res* **15**: 987-997

Kapranov P, St Laurent G, Raz T, Ozsolak F, Reynolds CP, Sorensen PH, Reaman G, Milos P, Arceci RJ, Thompson JF (2010) The majority of total nuclear-encoded non-ribosomal RNA in a human cell is 'dark matter' unannotated RNA. *BMC biology* **8**: 149

Katayama S, Tomaru Y, Kasukawa T, Waki K, Nakanishi M, Nakamura M, Nishida H, Yap CC, Suzuki M, Kawai J, Suzuki H, Carninci P, Hayashizaki Y, Wells C, Frith M, Ravasi T, Pang KC, Hallinan J, Mattick J, Hume DA, Lipovich L, Batalov S, Engstrom PG, Mizuno Y, Faghihi MA, Sandelin A, Chalk AM, Mottagui-Tabar S, Liang Z, Lenhard B, Wahlestedt C (2005) Antisense transcription in the mammalian transcriptome. *Science* **309**: 1564-1566

Khalil AM, Guttman M, Huarte M, Garber M, Raj A, Rivea Morales D, Thomas K, Presser A, Bernstein BE, van Oudenaarden A, Regev A, Lander ES, Rinn JL (2009) Many human large intergenic noncoding RNAs associate with chromatin-modifying complexes and affect gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**: 11667-11672

Kim TK, Hemberg M, Gray JM, Costa AM, Bear DM, Wu J, Harmin DA, Laptewicz M, Barbara-Haley K, Kuersten S, Markenscoff-Papadimitriou E, Kuhl D, Bito H, Worley PF, Kreiman G, Greenberg ME (2010) Widespread transcription at neuronal activity-regulated enhancers. *Nature* **465**: 182-187

Kino T, Hurt DE, Ichijo T, Nader N, Chrousos GP (2010) Noncoding RNA gas5 is a growth arrest- and starvation-associated repressor of the glucocorticoid receptor. *Sci Signal* **3**: ra8

Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J, LeVine R, McEwan P, McKernan K, Meldrim J, Mesirov JP, Miranda C, Morris W, Naylor J, Raymond C, Rosetti M, Santos R, Sheridan A, Sougnez C, Stange-Thomann N, Stojanovic N, Subramanian A, Wyman D, Rogers J, Sulston J, Ainscough R, Beck S, Bentley D, Burton J, Clee C, Carter N, Coulson A, Deadman R, Deloukas P, Dunham A, Dunham I, Durbin R, French L, Grafham D, Gregory S, Hubbard T, Humphray S, Hunt A, Jones M, Lloyd C, McMurray A, Matthews L, Mercer S, Milne S, Mullikin JC, Mungall A, Plumb R, Ross M, Shownkeen R, Sims S, Waterston RH, Wilson RK, Hillier LW, McPherson JD, Marra MA, Mardis ER, Fulton LA, Chinwalla AT, Pepin KH, Gish WR, Chissole SL, Wendl MC, Delehaunty KD, Miner TL, Delehaunty A, Kramer JB, Cook LL, Fulton RS, Johnson DL, Minx PJ, Clifton SW, Hawkins T, Branscomb E, Predki P, Richardson P, Wenning S, Slezak T, Doggett N, Cheng JF, Olsen A, Lucas S, Elkin C, Uberbacher E, Frazier M, Gibbs RA, Muzny DM, Scherer SE, Bouck JB, Sodergren EJ, Worley KC, Rives CM, Gorrell JH, Metzker ML, Naylor SL, Kucherlapati RS, Nelson DL, Weinstock GM, Sakaki Y, Fujiyama A, Hattori M, Yada T, Toyoda A, Itoh T, Kawagoe C, Watanabe H, Totoki Y, Taylor T, Weissenbach J, Heilig R, Saurin W, Artiguenave F, Brottier P, Bruls T, Pelletier E, Robert C, Wincker P, Smith DR, Doucette-Stamm L, Rubenfield M, Weinstock K, Lee HM, Dubois J, Rosenthal A, Platzer M, Nyakatura G, Taudien S, Rump A, Yang H, Yu J, Wang J, Huang G, Gu J, Hood L, Rowen L, Madan A, Qin S, Davis RW, Federspiel NA, Abola AP, Proctor MJ, Myers RM, Schmutz J, Dickson M, Grimwood J, Cox DR, Olson MV, Kaul R, Shimizu N, Kawasaki K, Minoshima S, Evans GA, Athanasiou M, Schultz R, Roe BA, Chen F, Pan H, Ramser J, Lehrach H, Reinhardt R, McCombie WR, de la Bastide M, Dedhia N, Blocker H, Hornischer K, Nordsiek G, Agarwala R, Aravind L, Bailey JA, Bateman A, Batzoglou S, Birney E, Bork P, Brown DG, Burge CB, Cerutti L, Chen HC, Church D, Clamp M, Copley RR, Doerks T, Eddy SR, Eichler EE, Furey TS, Galagan J, Gilbert JG, Harmon C, Hayashizaki Y, Haussler D, Hermjakob H, Hokamp K, Jang W, Johnson LS, Jones TA, Kasif S, Kasprzyk A, Kennedy S, Kent WJ, Kitts P, Koonin EV, Korf I, Kulp D, Lancet D, Lowe TM, McLysaght A, Mikkelsen T, Moran JV, Mulder N, Pollara VJ, Ponting CP, Schuler G, Schultz J, Slater G, Smit AF, Stupka E, Szustakowski J, Thierry-Mieg D, Thierry-Mieg J, Wagner L, Wallis J, Wheeler R, Williams A, Wolf YI, Wolfe KH, Yang SP, Yeh RF, Collins F, Guyer MS, Peterson J, Felsenfeld A, Wetterstrand KA, Patrinos A, Morgan MJ, de Jong P, Catanese JJ, Osoegawa K, Shizuya H, Choi S, Chen YJ (2001) Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**: 860-921

Lee J, Davidow LS, Warshawsky D (1999) Tsix, a gene antisense to Xist at the X-inactivation centre. *Nature genetics* **21**: 400-404

Lee JT (2009) Lessons from X-chromosome inactivation: long ncRNA as guides and tethers to the epigenome. *Genes Dev* **23**: 1831-1842

Lee JT (2010) The X as model for RNA's niche in epigenomic regulation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* **2**: a003749

Lee JT, Bartolomei MS (2013) X-inactivation, imprinting, and long noncoding RNAs in health and disease. *Cell* **152**: 1308-1323

Lewin B (1980) *Gene expression*, 2d edn. New York: Wiley.

Lewin R (1982) Repeated DNA still in search of a function. *Science* **217**: 621-623

Lipovich L, Johnson R, Lin CY (2010) MacroRNA underdogs in a microRNA world: evolutionary, regulatory, and biomedical significance of mammalian long non-protein-coding RNA. *Biochim Biophys Acta* **1799**: 597-615

Loewer S, Cabili MN, Guttman M, Loh YH, Thomas K, Park IH, Garber M, Curran M, Onder T, Agarwal S, Manos PD, Datta S, Lander ES, Schlaeger TM, Daley GQ, Rinn JL (2010) Large intergenic non-coding RNA-RoR modulates reprogramming of human induced pluripotent stem cells. *Nat Genet* **42**: 1113-1117

Lonard DM, O'Malley BW (2005) Expanding functional diversity of the coactivators. *Trends Biochem Sci* **30**: 126-132

Martianov I, Ramadass A, Serra Barros A, Chow N, Akoulitchev A (2007) Repression of the human dihydrofolate reductase gene by a non-coding interfering transcript. *Nature* **445**: 666-670

Mattick JS, Amaral PP, Dinger ME, Mercer TR, Mehler MF (2009) RNA regulation of epigenetic processes. *Bioessays* **31**: 51-59

Mercer TR, Dinger ME, Mattick JS (2009) Long non-coding RNAs: insights into functions. *Nat Rev Genet* **10**: 155-159

Mercer TR, Gerhardt DJ, Dinger ME, Crawford J, Trapnell C, Jeddloh JA, Mattick JS, Rinn JL (2012) Targeted RNA sequencing reveals the deep complexity of the human transcriptome. *Nature biotechnology* **30**: 99-104

Mirsky AE, Ris H (1951) The desoxyribonucleic acid content of animal cells and its evolutionary significance. *J Gen Physiol* **34**: 451-462

Mohammad F, Mondal T, Kanduri C (2009) Epigenetics of imprinted long noncoding RNAs. *Epigenetics* **4**: 277-286

Moran VA, Perera RJ, Khalil AM (2012) Emerging functional and mechanistic paradigms of mammalian long non-coding RNAs. *Nucleic Acids Res* **40**: 6391-6400

Mortazavi A, Williams BA, McCue K, Schaeffer L, Wold B (2008) Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature methods* **5**: 621-628

Nagano T, Fraser P (2011) No-nonsense functions for long noncoding RNAs. *Cell* **145**: 178-181

Nagano T, Mitchell JA, Sanz LA, Pauler FM, Ferguson-Smith AC, Feil R, Fraser P (2008) The Air noncoding RNA epigenetically silences transcription by targeting G9a to chromatin. *Science* **322**: 1717-1720

Neil H, Malabat C, d'Aubenton-Carafa Y, Xu Z, Steinmetz LM, Jacquier A (2009) Widespread bidirectional promoters are the major source of cryptic transcripts in yeast. *Nature* **457**: 1038-1042

Ohno S (1972) So much "junk" DNA in our genome. In *Brookhaven symposia in biology*, Vol. 23, pp 366-370.

Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H (2002a) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**: 563-573

Okazaki Y, Furuno M, Kasukawa T, Adachi J, Bono H, Kondo S, Nikaido I, Osato N, Saito R, Suzuki H, Yamanaka I, Kiyosawa H, Yagi K, Tomaru Y, Hasegawa Y, Nogami A, Schonbach C, Gojobori T, Baldarelli R, Hill DP, Bult C, Hume DA,

Quackenbush J, Schriml LM, Kanapin A, Matsuda H, Batalov S, Beisel KW, Blake JA, Bradt D, Brusic V, Chothia C, Corbani LE, Cousins S, Dalla E, Dragani TA, Fletcher CF, Forrest A, Frazer KS, Gaasterland T, Gariboldi M, Gissi C, Godzik A, Gough J, Grimmond S, Gustincich S, Hirokawa N, Jackson IJ, Jarvis ED, Kanai A, Kawaji H, Kawasaki Y, Kedzierski RM, King BL, Konagaya A, Kurochkin IV, Lee Y, Lenhard B, Lyons PA, Maglott DR, Maltais L, Marchionni L, McKenzie L, Miki H, Nagashima T, Numata K, Okido T, Pavan WJ, Perteu G, Pesole G, Petrovsky N, Pillai R, Pontius JU, Qi D, Ramachandran S, Ravasi T, Reed JC, Reed DJ, Reid J, Ring BZ, Ringwald M, Sandelin A, Schneider C, Semple CA, Setou M, Shimada K, Sultana R, Takenaka Y, Taylor MS, Teasdale RD, Tomita M, Verardo R, Wagner L, Wahlestedt C, Wang Y, Watanabe Y, Wells C, Wilming LG, Wynshaw-Boris A, Yanagisawa M, Yang I, Yang L, Yuan Z, Zavolan M, Zhu Y, Zimmer A, Carninci P, Hayatsu N, Hirozane-Kishikawa T, Konno H, Nakamura M, Sakazume N, Sato K, Shiraki T, Waki K, Kawai J, Aizawa K, Arakawa T, Fukuda S, Hara A, Hashizume W, Imotani K, Ishii Y, Itoh M, Kagawa I, Miyazaki A, Sakai K, Sasaki D, Shibata K, Shinagawa A, Yasunishi A, Yoshino M, Waterston R, Lander ES, Rogers J, Birney E, Hayashizaki Y (2002b) Analysis of the mouse transcriptome based on functional annotation of 60,770 full-length cDNAs. *Nature* **420**: 563-573

Onoguchi M, Hirabayashi Y, Koseki H, Gotoh Y (2012) A noncoding RNA regulates the neurogenin1 gene locus during mouse neocortical development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **109**: 16939-16944

Orgel LE, Crick FH (1980) Selfish DNA: the ultimate parasite. *Nature* **284**: 604-607

Orom UA, Derrien T, Beringer M, Gumireddy K, Gardini A, Bussotti G, Lai F, Zytnicki M, Notredame C, Huang Q, Guigo R, Shiekhattar R (2010) Long noncoding RNAs with enhancer-like function in human cells. *Cell* **143**: 46-58

Orom UA, Shiekhattar R (2013) Long noncoding RNAs usher in a new era in the biology of enhancers. *Cell* **154**: 1190-1193

Ota T, Suzuki Y, Nishikawa T, Otsuki T, Sugiyama T, Irie R, Wakamatsu A, Hayashi K, Sato H, Nagai K (2004) Complete sequencing and characterization of 21,243 full-length human cDNAs. *Nature genetics* **36**: 40-45

Pandey RR, Mondal T, Mohammad F, Enroth S, Redrup L, Komorowski J, Nagano T, Mancini-Dinardo D, Kanduri C (2008) Kcnq1ot1 antisense noncoding RNA mediates lineage-specific transcriptional silencing through chromatin-level regulation. *Mol Cell* **32**: 232-246

Payer B, Lee JT (2008) X chromosome dosage compensation: how mammals keep the balance. *Annu Rev Genet* **42**: 733-772

Peng X, Gralinski L, Armour CD, Ferris MT, Thomas MJ, Proll S, Bradel-Tretheway BG, Korth MJ, Castle JC, Biery MC, Bouzek HK, Haynor DR, Frieman MB, Heise M, Raymond CK, Baric RS, Katze MG (2010) Unique signatures of long noncoding RNA expression in response to virus infection and altered innate immune signaling. *MBio* **1**

Pertea M, Salzberg SL (2010) Between a chicken and a grape: estimating the number of human genes. *Genome Biol* **11**: 206

Pierpont ME, Yunis JJ (1977) Localization of chromosomal RNA in human G-banded metaphase chromosomes. *Experimental cell research* **106**: 303-308

Pink RC, Wicks K, Caley DP, Punch EK, Jacobs L, Carter DR (2011) Pseudogenes: pseudo-functional or key regulators in health and disease? *RNA* **17**: 792-798

Pontier DB, Gribnau J (2011) Xist regulation and function explored. *Hum Genet* **130**: 223-236

Ponting CP, Oliver PL, Reik W (2009) Evolution and functions of long noncoding RNAs. *Cell* **136**: 629-641

Porro A, Feuerhahn S, Reichenbach P, Lingner J (2010) Molecular dissection of telomeric repeat-containing RNA biogenesis unveils the presence of distinct and multiple regulatory pathways. *Mol Cell Biol* **30**: 4808-4817

Prensner JR, Iyer MK, Balbin OA, Dhanasekaran SM, Cao Q, Brenner JC, Laxman B, Asangani IA, Grasso CS, Kominsky HD, Cao X, Jing X, Wang X, Siddiqui J, Wei JT, Robinson D, Iyer HK, Palanisamy N, Maher CA, Chinnaiyan AM (2011) Transcriptome sequencing across a prostate cancer cohort identifies PCAT-1, an unannotated lincRNA implicated in disease progression. *Nat Biotechnol* **29**: 742-749

Ravasi T, Suzuki H, Pang KC, Katayama S, Furuno M, Okunishi R, Fukuda S, Ru K, Frith MC, Gongora MM, Grimmond SM, Hume DA, Hayashizaki Y, Mattick

JS (2006) Experimental validation of the regulated expression of large numbers of non-coding RNAs from the mouse genome. *Genome Res* **16**: 11-19

Rearick D, Prakash A, McSweeney A, Shepard SS, Fedorova L, Fedorov A (2011) Critical association of ncRNA with introns. *Nucleic Acids Res* **39**: 2357-2366

Redon S, Reichenbach P, Lingner J (2010) The non-coding RNA TERRA is a natural ligand and direct inhibitor of human telomerase. *Nucleic Acids Res* **38**: 5797-5806

Rhee HS, Pugh BF (2012) Genome-wide structure and organization of eukaryotic pre-initiation complexes. *Nature* **483**: 295-301

Rinn JL, Euskirchen G, Bertone P, Martone R, Luscombe NM, Hartman S, Harrison PM, Nelson FK, Miller P, Gerstein M, Weissman S, Snyder M (2003) The transcriptional activity of human Chromosome 22. *Genes Dev* **17**: 529-540

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E (2007a) Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-1323

Rinn JL, Kertesz M, Wang JK, Squazzo SL, Xu X, Brugmann SA, Goodnough LH, Helms JA, Farnham PJ, Segal E, Chang HY (2007b) Functional demarcation of active and silent chromatin domains in human HOX loci by noncoding RNAs. *Cell* **129**: 1311-1323

Schmitz KM, Mayer C, Postepska A, Grummt I (2010) Interaction of noncoding RNA with the rDNA promoter mediates recruitment of DNMT3b and silencing of rRNA genes. *Genes Dev* **24**: 2264-2269

Shoemaker CJ, Green R (2012) Translation drives mRNA quality control. *Nat Struct Mol Biol* **19**: 594-601

Spitale RC, Tsai MC, Chang HY (2011) RNA templating the epigenome: long noncoding RNAs as molecular scaffolds. *Epigenetics* **6**: 539-543

Stadtfeld M, Apostolou E, Akutsu H, Fukuda A, Follett P, Natesan S, Kono T, Shioda T, Hochedlinger K (2010) Aberrant silencing of imprinted genes on

chromosome 12qF1 in mouse induced pluripotent stem cells. *Nature* **465**: 175-181

Stoger R, Kubicka P, Liu CG, Kafri T, Razin A, Cedar H, Barlow DP (1993) Maternal-specific methylation of the imprinted mouse *Igf2r* locus identifies the expressed locus as carrying the imprinting signal. *Cell* **73**: 61-71

Sultan M, Schulz MH, Richard H, Magen A, Klingenhoff A, Scherf M, Seifert M, Borodina T, Soldatov A, Parkhomchuk D, Schmidt D, O'Keeffe S, Haas S, Vingron M, Lehrach H, Yaspo ML (2008) A global view of gene activity and alternative splicing by deep sequencing of the human transcriptome. *Science* **321**: 956-960

Sun BK, Deaton AM, Lee JT (2006) A transient heterochromatic state in Xist preempts X inactivation choice without RNA stabilization. *Mol Cell* **21**: 617-628

Thomas CA, Jr. (1971) The genetic organization of chromosomes. *Annu Rev Genet* **5**: 237-256

Tian D, Sun S, Lee JT (2010) The long noncoding RNA, *Jpx*, is a molecular switch for X chromosome inactivation. *Cell* **143**: 390-403

Trang P, Weidhaas JB, Slack FJ (2008) MicroRNAs as potential cancer therapeutics. *Oncogene* **27 Suppl 2**: S52-57

Tripathi V, Ellis JD, Shen Z, Song DY, Pan Q, Watt AT, Freier SM, Bennett CF, Sharma A, Bubulya PA, Blencowe BJ, Prasanth SG, Prasanth KV (2010) The nuclear-retained noncoding RNA MALAT1 regulates alternative splicing by modulating SR splicing factor phosphorylation. *Mol Cell* **39**: 925-938

Tsai MC, Manor O, Wan Y, Mosammaparast N, Wang JK, Lan F, Shi Y, Segal E, Chang HY (2010) Long noncoding RNA as modular scaffold of histone modification complexes. *Science* **329**: 689-693

Ulitsky I, Bartel DP (2013) lincRNAs: genomics, evolution, and mechanisms. *Cell* **154**: 26-46

Ulitsky I, Shkumatava A, Jan CH, Sive H, Bartel DP (2011) Conserved function of lincRNAs in vertebrate embryonic development despite rapid sequence evolution. *Cell* **147**: 1537-1550

van Bakel H, Nislow C, Blencowe BJ, Hughes TR (2010) Most “dark matter” transcripts are associated with known genes. *PLoS biology* **8**: e1000371

van Bakel H, Nislow C, Blencowe BJ, Hughes TR (2011) Response to “the reality of pervasive transcription”. *PLoS biology* **9**: e1001102

Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, Chen N, Sun F, Fan Q (2010) CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res* **38**: 5366-5383

Wang J, Zhang J, Zheng H, Li J, Liu D, Li H, Samudrala R, Yu J, Wong GK-S (2004) Mouse transcriptome: neutral evolution of ‘non-coding’ complementary DNAs. *Nature* **431**

Wang KC, Chang HY (2011) Molecular mechanisms of long noncoding RNAs. *Mol Cell* **43**: 904-914

Wang KC, Helms JA, Chang HY (2009) Regeneration, repair and remembering identity: the three Rs of Hox gene expression. *Trends Cell Biol* **19**: 268-275

Wang KC, Yang YW, Liu B, Sanyal A, Corces-Zimmerman R, Chen Y, Lajoie BR, Protacio A, Flynn RA, Gupta RA, Wysocka J, Lei M, Dekker J, Helms JA, Chang HY (2011) A long noncoding RNA maintains active chromatin to coordinate homeotic gene expression. *Nature* **472**: 120-124

Wang X, Arai S, Song X, Reichart D, Du K, Pascual G, Tempst P, Rosenfeld MG, Glass CK, Kurokawa R (2008) Induced ncRNAs allosterically modify RNA-binding proteins in cis to inhibit transcription. *Nature* **454**: 126-130

Willingham AT, Orth AP, Batalov S, Peters EC, Wen BG, Aza-Blanc P, Hogenesch JB, Schultz PG (2005) A strategy for probing the function of noncoding RNAs finds a repressor of NFAT. *Science* **309**: 1570-1573

Wilusz JE, Sunwoo H, Spector DL (2009) Long noncoding RNAs: functional surprises from the RNA world. *Genes Dev* **23**: 1494-1504

Winter J, Jung S, Keller S, Gregory RI, Diederichs S (2009) Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nat Cell Biol* **11**: 228-234

Yunis JJ, Yasmineh WG (1971) Heterochromatin, satellite DNA, and cell function. Structural DNA of eucaryotes may support and protect genes and aid in speciation. *Science* **174**: 1200-1209

Zhao J, Ohsumi TK, Kung JT, Ogawa Y, Grau DJ, Sarma K, Song JJ, Kingston RE, Borowsky M, Lee JT (2010) Genome-wide identification of polycomb-associated RNAs by RIP-seq. *Mol Cell* **40**: 939-953

Zhao J, Sun BK, Erwin JA, Song JJ, Lee JT (2008) Polycomb proteins targeted by a short repeat RNA to the mouse X chromosome. *Science* **322**: 750-756