

Zapojení PIWI-interagujících RNA do procesů kancerogeneze prostřednictvím regulace genové exprese

Involvement of PIWI-interacting RNAs in Cancerogenesis via the Regulation of Gene Expression

Rybecká S., Štítkovcová K., Vychytilová-Faltejsková P., Slabý O.

CEITEC – Středoevropský technologický institut, MU, Brno

Souhrn

Východiska: Za poslední desetiletí přibýly stovky studií, jež souhlasně prokázaly, že krátké nekódující RNA jsou slibnými diagnostickými, prognostickými a prediktivními biomarkery nádorových onemocnění. Významnou podskupinu těchto molekul představují RNA interagující s PIWI proteiny, označované jako piRNA. Tyto krátké RNA se podílejí na regulaci genové exprese na transkripční nebo post-transkripční úrovni, jejich hlavní úlohou je však epigenetické umlčování transpozibilních elementů LINE a SINE, čímž významně přispívají k udržení genomové stability. Dále se účastní důležitých buněčných procesů, jakými jsou gametogeneze, segregace chromozomů či sebeobnova kmenových buněk. Přestože byly piRNA poprvé detekovány v zárodečných buňkách, bylo zjištěno, že se vyskytují ve vysokých hladinách také v jiných lidských tkáních, přičemž jejich exprese vykazuje tkáňovou specifitu. První studie rovněž prokázaly změněný expresní profil piRNA u pacientů s nádorovými onemocněními. Funkce těchto molekul v procesu kancerogeneze však zatím zůstávají neobjasněné. Do popředí zájmu se v poslední době též dostávají volně cirkulující piRNA v tělních tekutinách, které nabízejí široké využití pro včasný záchyt nádorových onemocnění, predikci léčebné odpovědi či stanovení prognózy pacientů. **Cíl:** Tento přehledový článek jako první v českém jazyce shrnuje dosavadní poznatky o biogenezi piRNA, o jejich strategii při umlčování transpozibilních elementů a dalších genů. Poskytuje rovněž ucelený přehled o piRNA s deregulovanou expresí u lidských nádorových onemocnění a klade důraz na jejich potenciální diagnostické a terapeutické využití.

Klíčová slova

PIWI-interagující RNA – piRNA – biogeneze – nádorové onemocnění – umlčování transpozónů – biomarkery – terapeutické cíle

Výsledky tohoto výzkumu byly získány v rámci projektu CEITEC 2020 (LQ1601) za finančního příspěví Ministerstva školství, mládeže a tělovýchovy České republiky v rámci účelové podpory z prostředků Národního programu udržitelnosti II.

The results of this research have been acquired within CEITEC 2020 (LQ1601) project with financial contribution made by the Ministry of Education, Youths and Sports of the Czech Republic within special support paid from the National Programme for Sustainability II funds.

Autoři deklarují, že v souvislosti s předmětem studie nemají žádné komerční zájmy.

The authors declare they have no potential conflicts of interest concerning drugs, products, or services used in the study.

Redakční rada potvrzuje, že rukopis práce splnil ICMJE kritéria pro publikace zaslané do biomedicínských časopisů.

The Editorial Board declares that the manuscript met the ICMJE recommendation for biomedical papers.



doc. RNDr. Ondřej Slabý, Ph.D.
CEITEC – Středoevropský
technologický institut
Masarykova univerzita
Kamenice 753/5
625 00 Brno
e-mail: ondrej.slaby@ceitec.muni.cz

Obdrženo/Submitted: 23. 11. 2016
Přijato/Accepted: 5. 12. 2016

<http://dx.doi.org/10.14735/amko2016428>

Summary

Background: In the past few years, a number of studies have suggested that small non-coding RNAs could be promising diagnostic, prognostic and predictive biomarkers in oncology. Recently, small RNAs interacting with PIWI proteins (piRNAs) have been described. These small RNAs regulate gene expression at transcriptional and post-transcriptional levels; however, they appear to be specifically involved in silencing the transposable elements LINE and SINE and are thus considered to contribute to genomic stability. Furthermore, piRNAs participate also in other important biological processes, such as gametogenesis, chromosome segregation, and stem cell self-renewal. Although their expression was first noted in germ line cells, they are now known to be present in all tissue types and their expression is highly tissue-specific. In addition, piRNA expression is dysregulated in tumor tissues. Nevertheless, the exact function of these molecules in cancerogenesis is not known. Recently, free circulating piRNAs were reported to be stably present in body fluids, suggesting that they could serve as promising noninvasive biomarkers to enable early diagnosis, therapy response prediction, and accurate prognosis prediction of cancer patients. **Aim:** The aim of this review is to summarize current knowledge about piRNA biogenesis and their functions in the regulation of gene expression and transposons silencing. In addition, the review focuses on piRNAs that show dysregulated expression in different types of cancers and that could serve as potential diagnostic biomarkers and/or therapeutic targets.

Key words

PIWI-interacting RNAs – piRNA – biogenesis – cancer – transposon silencing – biomarkers – therapeutic targets

Úvod

Nádorová choroba je často vnímána jako onemocnění, jehož podstatou je kumulace genetických mutací, k nimž dochází v důsledku genomové nestability. Mezi typické biologické důsledky těchto mutací potom patří nadměrná proliferace nádorových buněk, rezistence vůči signálům zastavujícím buněčný cyklus, neomezený replikační potenciál, zvýšená invazivita či schopnost zakládat vzdálené metastázy. Jednotlivé mutace mohou dále indukovat angiogenezi, necitlivost k apoptotickým signálům, deregulaci buněčné energetiky, únik před imunitním systémem a zánětlivé procesy. Genomová nestabilita je tedy podmiňujícím znakem vzniku nádorového onemocnění [1]. Ze současných poznatků dále vyplývá, že jednou z příčin genomové nestability jsou rovněž deregulace na epigenetické úrovni. Jako epigenetické jsou označovány dědičné změny v genové expresi, které nesouvisí se změnami v primárním genetickém kódu. Mezi hlavní mechanismy, jež regulují genovou expresi na transkripční či post-transkripční úrovni, patří především metylace DNA, modifikace histonů a dále též regulace prostřednictvím nekódujících RNA [2,3]. Nedávné studie odhalily novou skupinu krátkých nekódujících RNA, které hrají významnou roli při udržování stability genomu. Úlohou těchto molekul je zejména umlčování transpozonů a regulace genové exprese na transkripční či post-transkripční úrovni. Od roku 2006 jsou známy pod názvem PIWI-interagující RNA (piRNA).

V posledních 10 letech bylo prokázáno, že hladiny těchto nekódujících RNA jsou významně deregulovány rovněž u řady nádorových onemocnění.

PIWI-interagující RNA

PiRNA jsou krátké jednořetězcové RNA o délce 24–32 nukleotidů [4] hrající významnou roli při vývoji zárodečných buněk, a především pak při udržování genomové stability v důsledku umlčování transpozibilních elementů (TE) [5]. Tyto repetitivní elementy tvoří asi polovinu genomu člověka a hrají důležitou úlohu ve struktuře chromatinu, čímž ovlivňují i expresi přilehlých genů [6–8]. PiRNA byly pojmenovány na základě schopnosti vázat se na proteiny PIWI patřící do rodiny AGO (Argonaute) proteinů [9]. AGO proteiny se dělí na podrodiny AGO a PIWI. Lidské geny *AGO1–4* jsou lokalizovány na chromozomu 1, lidská podrodina PIWI proteinů zahrnuje HIWI1, HIWI2, HIWI3 a HILI, které jsou kódovány geny na chromozomech 12, 11, 22 a 8 [10]. Argonautové proteiny jsou složeny ze dvou hlavních domén – N-terminální PAZ (Piwi-Argonaute-Zwille) domény a C-terminální PIWI domény. Délka PAZ čítá přibližně 120 aminokyselin, PIWI doména je dlouhá přibližně 400 aminokyselin. PIWI doména se dále skládá ze dvou částí, Mid/A a PIWI/B, přičemž PIWI/B katalyzuje aktivitu enzymu Slicer (RNáza H), který se účastní biogeneze piRNA. Mid doména váže 5' fosfátové konce krátkých RNA a funguje jako kotva vazby RNA na AGO proteiny, zatímco 3' konce krátkých

RNA se vážou na doménu PAZ [11–13]. PIWI proteiny se účastní biogeneze piRNA, vývoje zárodečných buněk, gametogeneze a dalších buněčných pochodů. V důsledku mutací genů pro PIWI vznikají defekty v gametogenezi, dochází ke ztrátě zárodečné linie kmenových buněk, k pozastavení meiózy a blokcím spermatogeneze. Předpokládá se, že piRNA působí jako sekvenčně specifická vodítka PIWI proteinů umožňující regulaci exprese transpozonů a protein kódovaných genů [14].

První studie zabývající se regulačním potenciálem piRNA u savců pochází z roku 2006. Aravin et al [15] popsali skupinu malých nekódujících RNA v samčích zárodečných buňkách u *Mus musculus*, jejichž délka se pohybovala v rozmezí 26–31 nukleotidů. Ve stejné době Girard et al [16] popsali skupinu malých nekódujících RNA, které se vážou na proteiny MIWI z rodiny myších PIWI proteinů a jsou hojně zastoupené ve varlatech myši. Jedna z prvních studií, která propojila piRNA s genomovou nestabilitou, se věnovala mutacím v genech pro Zucchini (ZUC) a Squash (SQU). Produkty těchto genů obsahují doménu homologickou s nukleázou a účastní se procesu RNA interference v zárodečných buňkách u *Drosophila melanogaster*. Mutantní samičky jsou sterilní a vykazují defekty v dorzoventrální orientaci v průběhu oogeneze. Mutace těchto genů rovněž souvisí se zvýšenou expresí HET-A a TART, dvou telomerově specifických transpozonů. Výsledky této studie naznačují, že k nadměrné aktivitě trans-

pozornosti může docházet v důsledku mutací v genech, jež se podílejí na vzniku a správném fungování piRNA [17]. Role piRNA při ochraně stability genomu byla popsána také u kuřat. S využitím sekvenování nové generace byly stanoveny expresní profily vybraných piRNA a několika genů asociovaných s piRNA v primordiálních zárodečných buňkách. Všechny analyzované geny byly u primordiálních zárodečných buněk vysoce exprimované. Zároveň bylo provedeno umlčení dvou známých genů souvisejících s dráhou piRNA – *C1WI* (*chicken PIWI-like protein 1*) a *C1LI* (*chicken PIWI-like protein 2*). Po vyřazení těchto genů došlo ke změnám v expresi několika genů vázaných na piRNA a také ke zvýšenému výskytu dvouvláknových zlomů DNA v primordiálních zárodečných buňkách [18]. Významné funkce piRNA ve spojitosti s ochranou před transpozibilními elementy byly pozorovány rovněž v zárodečných buňkách myši, kde jsou piRNA schopné navodit metylaci DNA v oblasti CpG [19,20]. Kromě toho se tyto malé molekuly podílejí na udržování metylačního stavu histonů (H3K9me3) na repetitivních sekvencích typu LINEs v zárodečných buňkách [21]. Tato represe chromatinu zprostředkovaná pomocí piRNA cílí výhradně na elementy plné délky, které jsou aktivní. Toto zjištění odkrývá pozoruhodnou schopnost piRNA rozpoznávat aktivní elementy z množství fragmentů genomických transpozonů, které buňka obsahuje. Tyto studie a mnohé další potvrzují schopnost piRNA udržovat genomovou stabilitu prostřednictvím tlumení TE.

Přestože prvotní studie předpokládaly, že mechanismy účinku piRNA jsou spojeny výhradně se zárodečnými buňkami, v roce 2012 Rajasethupathy et al [22] prokázali hojnou expresi piRNA o délce 28 nukleotidů v CNS zeje obrovského (*Aplysia depilans*). Tyto piRNA jsou lokalizované převážně v jádře a vyznačují se unikátním typem biogeneze. Výsledky studie naznačují, že piRNA se účastní dlouhodobých změn v neuronech, které vedou k udržování paměti. Zvýšená exprese piRNA byla následně popsána i v hipokampu myši, což naznačuje možnou účast těchto molekul na morfogenezi páteře prostřednictvím

regulace exprese genů zodpovědných za její vývoj [23]. Nejnovější studie potvrdily, že piRNA jsou abundančně exprimované téměř ve všech lidských tkáních, přičemž jejich exprese vykazuje tkáňovou specifitu [24].

Biogeneze piRNA

Dosavadní studie naznačují, že v biogenezi, tedy v procesech, které vedou ke vzniku maturovaných molekul piRNA, jsou mezidruhové rozdíly a tyto signální dráhy jsou navíc odlišné od drah biogeneze miRNA a siRNA [25]. PiRNA původem vychází z mezigenových repetitivních elementů, tzv. piRNA klastrů. Klastry jsou součástí heterochromatinu bohatého na transpozony [26]. Na rozdíl od miRNA a siRNA jsou piRNA generované z jednovláknových prekurzorů, které nevyžadují RNázu III [27]. Dalším rozdílem je asociace s odlišnými členy podrodiny Argonautových proteinů. Zatímco piRNA interagují s podrodinou PIWI, miRNA a siRNA interagují primárně s proteiny podrodiny AGO. Molekuly piRNA se liší od miRNA a siRNA také svou délkou, která čítá o několik nukleotidů více. Mezi různými živočichy, dokonce i mezi příbuznými druhy, jsou však velké rozdíly v maturovaných sekvencích piRNA. Zatímco u *Drosophila melanogaster* a většiny obratlovců byly identifikovány piRNA o délce 24–32 nukleotidů, u *Caenorhabditis elegans* se vyskytují piRNA o délce 21 nukleotidů a označují se jako 21U-RNA [28]. U většiny organismů jsou pak zpravidla popisovány dvě rozdílné dráhy biogeneze piRNA v závislosti na tom, zda se jedná o buňky somatické, nebo zárodečné. Zatímco v somatických buňkách jsou piRNA přepisovány pouze z jednoho vlákna, v zárodečných buňkách probíhá transkripce z obou vláken takzvaného duálního klastru piRNA. V případě zárodečných buněk pak probíhá kromě primární biogeneze i sekundární dráha zpracování piRNA (tzv. ping-pong cyklus).

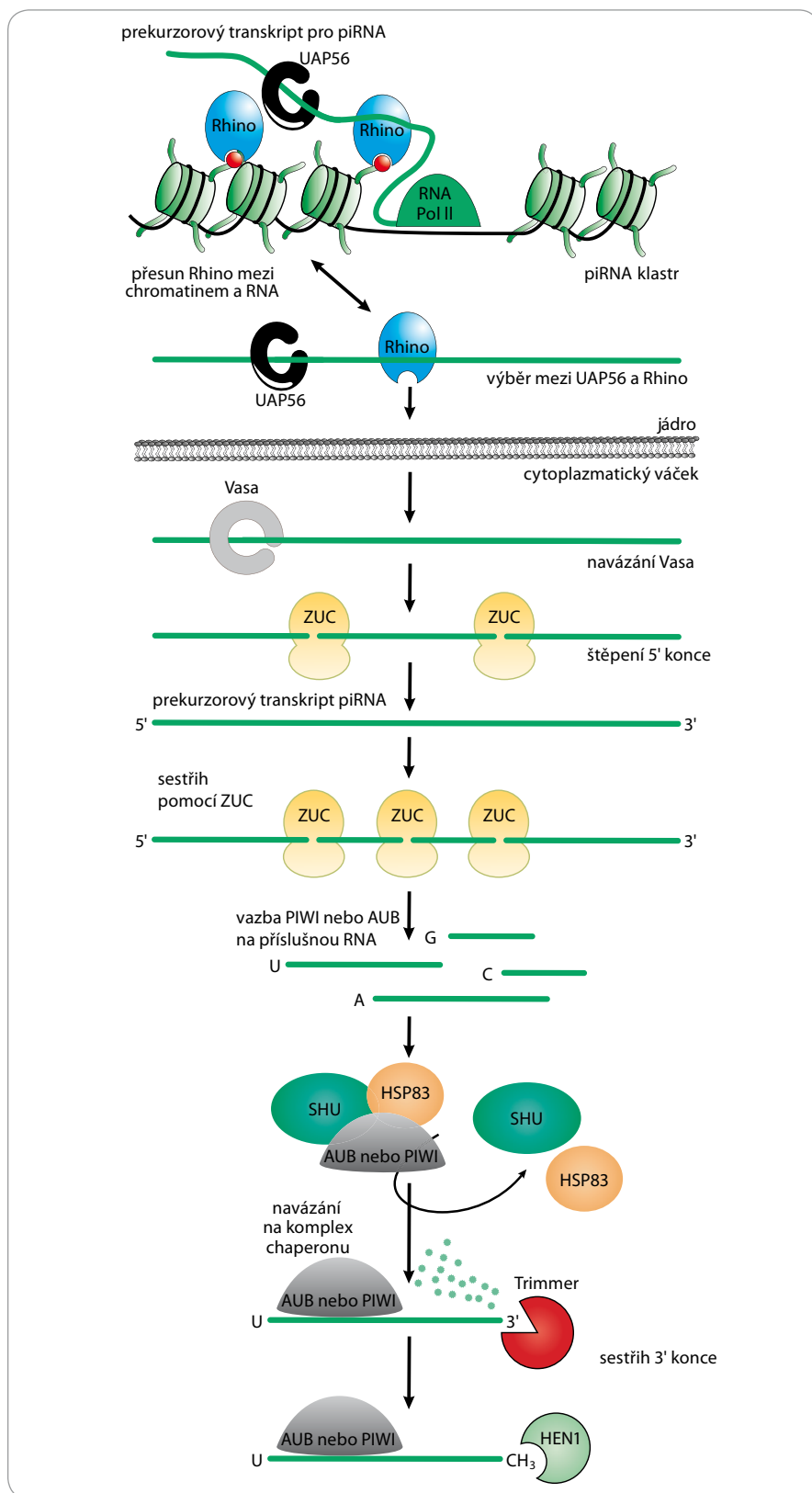
Primární biogeneze piRNA

PiRNA původem vychází z mezigenových repetitivních elementů, tzv. piRNA klastrů. Klastry jsou součástí heterochromatinu bohatého na transpozony [29]. Tyto sekvence pokrývají velkou část ge-

nomu a jejich velikost se pohybuje od 100 kb výše [30]. V průběhu primární biogeneze jsou geny pro piRNA přepisovány pomocí RNA polymerázy II. Na procesu transkripce se rovněž podílí heterochromatinový protein HP1 zvaný Rhino, který se váže na některé lokusy genů kódujících piRNA, a dále na helikázu UAP56, s níž interaguje. Vlastní transkript je vázán proteinem UAP56 na vnitřní straně jaderné membrány a poté je přenesen pomocí RNA helikázy Vasa do cytoplazmatického váčku [31–33]. Zde probíhá sestřih prekurzorového transkriptu pomocí endonukleázy ZUC (analog u myši je PLD6 – fosfolipáza D6), jež je lokalizována na vnější mitochondriální membráně a generuje 5' konec budoucí piRNA odštěpením fosfátového zbytku z uridinu za vzniku hydroxylového konce, na který se přednostně vážou PIWI proteiny. Vazba Argonautových PIWI/AUB proteinů (MILI a MIWI u *Mus musculus*) na piRNA je usnadněna díky chaperonovým proteinům HSP83 (heat shock protein 83) a SHU (Shutdown), které se následně odštěpí. Poté je sestřižen 3' konec enzymem zvaným Trimmer, a to až k místu navázání proteinů PIWI/AUB. Takto upravený 3' konec je následně metylován pomocí komplexu HEN1/Primet za vzniku 2'-O-metylovaného konce, který zajišťuje zvýšenou stabilitu zralých piRNA. Výstupem primární biogeneze je „primární“ piRNA (antisense vlákno) vázající proteiny PIWI/AUB (obr. 1). Takto vytvořený komplex vstupuje zpět do jádra, kde dochází k transkripčnímu umlčování transpozonů [32,34].

Sekundární biogeneze piRNA

K sekundární biogenezi piRNA dochází především v zárodečných buňkách a pro iniciaci tohoto tzv. ping-pong cyklu je vyžadována primární piRNA (antisense vlákno) s navázanými proteiny PIWI/AUB, jež je produktem primární biogeneze. Ping-pong cyklus začíná navázáním komplexu „primární“ piRNA/AUB na komplementární vlákno transpozónálního (sense) transkriptu, čímž dochází k jeho umlčení a zároveň k tvorbě „sekundární“ piRNA. Vlákna sense a antisense piRNA jsou vázána prostřednictvím prvních 10 nukleo-



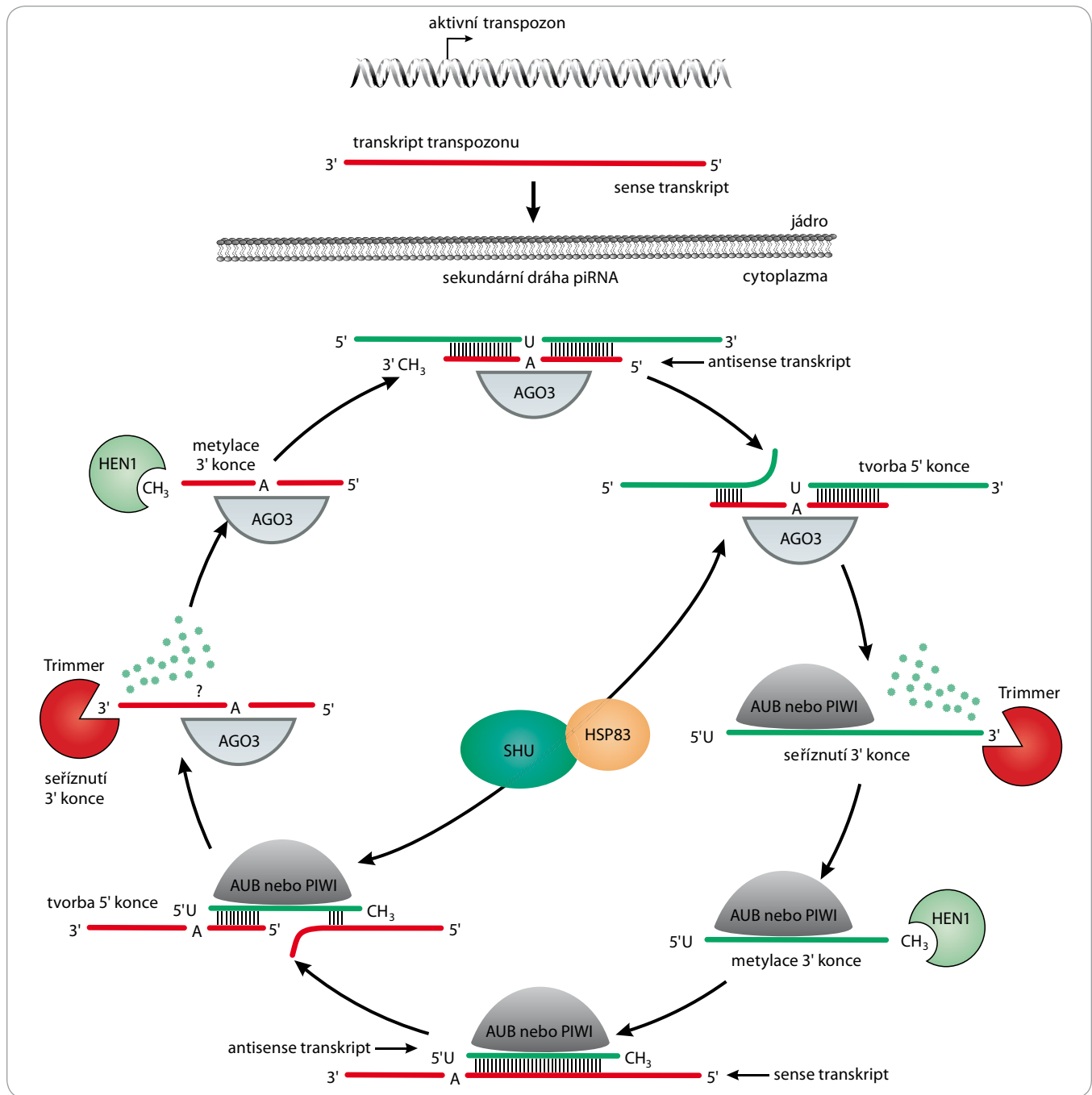
Obr. 1. Primární dráha biogeneze piRNA. Upraveno dle [4].

Geny pro piRNA jsou přepisovány pomocí RNA polymerázy II za účasti proteinu Rhino a helikázy UAP56. Primární transkript je následně prostřednictvím helikázy Vasa přenesen z jádra do cytoplazmy, kde je sestřížen endonukleázou ZUC. Následně dochází k vazbě proteinů PIWI/AUB a sestřížení 3' konce pomocí enzymu Trimmer, který je dále metylován metyltransferázou HEN1.

tidů. V této fázi cyklu dochází k tvorbě 5' konce vlákna piRNA pomocí proteinu AUB, který funguje jako enzym Slicer (opět s pomocí SHU a HSP83), a navázání proteinu AGO3 v místě 10. nukleotidu obsahujícího adenin. Na odstranění 5' konce po sestřihu vlákna pomocí AUB se pravděpodobně podílí protein SHU. Následně dochází k sestřihu 3' konce pomocí exonukleázy Trimmer a jeho metylaci pomocí HEN1. Metylovaný fragment v komplexu s AGO3 váže antisense transkript pro piRNA a zajišťuje jeho sestřih. Takto upravený řetězec opětovně váže AUB proteiny, podstupuje sestřih 3' konce a jeho metylaci, čímž dochází k uzavření celého cyklu a amplifikaci vznikajících piRNA (obr. 2) [31,32,35].

Mechanismy regulace genové exprese prostřednictvím piRNA

Za nejpodstatnější funkci komplexů PIWI/piRNA je považována schopnost represe mobilních elementů DNA. Tento předpoklad je podpořený zejména faktem, že piRNA obsahují komplementární sekvence vůči transpozonomům, jež jsou proto považovány za hlavní cíl jejich aktivity. Tato skutečnost byla opakovaně prokázána nezávislými studiemi napříč několika živočišnými druhy, jakými jsou *Drosophila melanogaster* [27], *Mus musculus* [15] či *Danio rerio* [25]. Zajímavé je, že osud komplexu PIWI/piRNA (jeho konkrétní lokalizace v jádře nebo v cytoplasmě a možný mechanismus účinku umlčování) závisí na podskupině proteinů z rodiny PIWI, se kterou je piRNA asociována. Pokud je piRNA asociována s proteiny PIWI, nachází se komplex v jádře, a může tak docházet k umlčování genové exprese na transkripční úrovni. Pokud je piRNA asociována s proteiny AUB, bude se tento komplex nacházet v perinukleárním prostoru [27]. Podobných závěrů bylo dosaženo v případě myšního modelu, kdy se zralé piRNA asociované s proteiny MILI nacházely v cytoplasmě, zatímco komplexy MIWI/piRNA byly translokovány do jádra [19,36]. Nedávné studie pak prokázaly, že k umlčování TE a regulaci exprese genů prostřednictvím piRNA může docházet především cestou metylace DNA, v důsledku modifikací histonů a chromatinu, a v neposlední řadě



Obr. 2. Sekundární dráha biogeneze piRNA (ping-pong cyklus). Upraveno dle [4].

Cyklus začíná vazbou primárního komplexu piRNA/AUB na komplementární vlákno transpozonálního transkriptu. Toto vlákno je následně štěpeno a vzniká sekundární piRNA vázající protein AGO3, jež je opět sestřižena pomocí enzymu Trimmer a metylována za účasti metyltransferázy HEN1. Sekundární piRNA poté váže antisense transkript pro piRNA a zajišťuje jeho sestřih. Celý cyklus vede k amplifikaci vznikajících piRNA.

těž na základě post-transkripčního umlčování genové exprese (obr. 3).

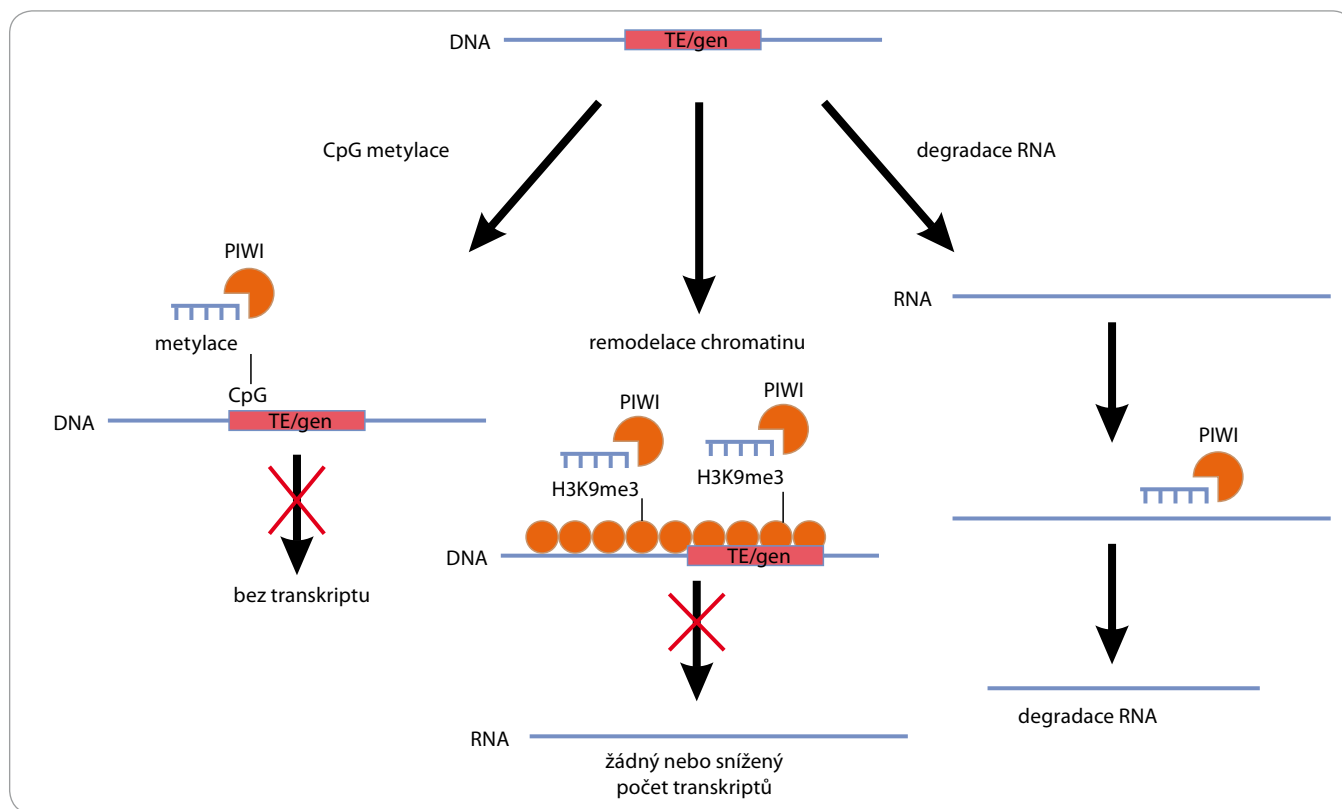
Metylace DNA jako mechanismus umlčování transpozonů

Kovalentní modifikace DNA prostřednictvím metylace cytozinových zbytků

je dědičný, avšak reverzibilní proces. Metylace DNA se podílí na regulaci genové exprese, inaktivaci chromozomu X, genomickém imprintingu a na početných modifikacích chromatinu. Nedávné studie prokázaly zásadní roli piRNA při metylaci mobilních ele-

mentů v zárodečných a somatických buňkách.

Kuramochi-Miyagawa et al [20] prokázali spojitost mezi expresí PIWI/piRNA a umlčováním TE v zárodečných buňkách myši, kdy v důsledku delece genů pro myši PIWI proteiny MIL1 a MIWI2 nedochá-



Obr. 3. Mechanizmy regulace genové exprese prostřednictvím piRNA.

K umlčování transpozibilních elementů (TE) a regulaci genové exprese může docházet prostřednictvím metylace CpG oblastí na DNA, v důsledku remodelace chromatinu či na základě post-transkripčního umlčování vazbou komplexů PIWI/piRNA ke komplementárním sekvencím mRNA.

zelo k tvorbě komplexů MILI/MIWI2/piRNA a následné metylaci TE, jež by utlumila aktivitu těchto mobilních elementů. K podobným výsledkům dospěla další studie provedená na myších s deletovaným genem *TDRD1* (*protein s doménou Tudor 1*) [37]. Autoři zde identifikovali protein TDRD1, jenž je asociovaný s komplexem MILI/piRNP (PIWI ribonukleoprotein) u dospělých samců během spermatogeneze. Stejně jako u mutantů MILI, tak i u myší s chybějícím TDRD1 byla prokázána snížená metylace DNA vedoucí ke zvýšené aktivitě transpozonu L1.

Methylace DNA prostřednictvím komplexů PIWI/piRNA byla prokázána i v CNS zeje obrovského [22]. Expresní profilování malých RNA v mozku dospělých jedinců prokázalo přítomnost hojně se vyskytujících krátkých RNA o délce 28 nukleotidů. Tyto piRNA byly senzitivní na serotonin, jenž je důležitým neurotransmiterem a významně se podílí na mechanismech dlouhodobé paměti.

Komplex PIWI/piRNA v tomto případě ulehčoval na serotoninu závislou metylaci CpG ostrova v oblasti promotoru CREB2 (cAMP response element binding protein 2), který je inhibiátorem dlouhodobé paměti.

Z výše uvedených studií vyplývá, že metylace DNA prostřednictvím komplexu PIWI/piRNA je mezidruhově rozmanitá a představuje důležitý nástroj epigenetické regulace jak v zárodečných, tak somatických buňkách organismů.

Vliv histonových modifikací a struktury chromatinu na expresi transpozonů a okolních genů

PIWI proteiny v asociaci s piRNA jsou zapojené nejen do metylace DNA, ale také do regulace histonových modifikací, které vedou rovněž k umlčování mobilních elementů. K tomuto umlčování TE dochází zpravidla v důsledku metylace lysinu 9, jenž je součástí histonu 3 (H3K9me3). Tato histonová modifikace vede ke vzniku heterochromatinu

a ovlivňuje nejen transkripci vlastních mobilních elementů, ale též expresi přílehlých genů [38].

Le Thomas et al [39] dále prokázali, že přestože je asociace PIWI proteinů s cílovou strukturou chromatinu pouze dočasná, může vést k trvalému umlčení exprese genů či TE v důsledku zvýšené metylace jednotlivých histonů a vytvoření transkripčně inaktivního heterochromatinu. Podobná situace byla popsána i v případě *Caenorhabditis elegans*, kdy přítomnost komplexu PRG-1/21U RNA umožnila vznik heterochromatinu [40,41]. Zajímavé přitom je, že vazba komplexu PRG-1/21U RNA na cílové oblasti chromatinu hraje klíčovou roli pouze v iniciaci celého procesu, zatímco následná kontinuální represe přetrvávající napříč generacemi závisí na jaderných proteinech HRDE1/WAGO-9 z Argonauťové rodiny a histon-metyltransferázách SET-25 a SET32 [42].

Další studie z roku 2014 na myších prokazuje, že přítomnost piRNA je nezbytná

pro udržení vysoké úrovně represivní histonové modifikace H3K9me3 u elementů typu LINE v zárodečných buňkách. Tato chromatinová represe zprostředkovaná piRNA je nejvíce selektivní, neboť dochází pouze k umlčování elementů plné délky, které jsou z rodin LINE a jsou schopné aktivní transpozice [21].

Regulace exprese genů a mobilních elementů na post-transkripční úrovni

K post-transkripčnímu umlčování genové exprese dochází zpravidla prostřednictvím vazby piRNA na cílové sekvence retrotranspozónů, jež jsou součástí 3' nepřekládaných oblastí téměř 30 % myších či lidských mRNA [43]. Zároveň bylo prokázáno, že piRNA mohou přímo regulovat také geny s retrotranspozonní sekvencí v 5' nepřekládané oblasti [44].

Příkladem post-transkripčního umlčení exprese genů je regulace mRNA prostřednictvím piRNA derivovaných z pseudogenů. Tyto oblasti mohou produkovat tzv. *trans*-elementy – piRNA, které regulují mRNA z funkčních genů. PiRNA mohou být produkovány nejen z nefunkčních pseudogenů, ale také z protismyslného vlákna funkčního genu. V takovém případě mluvíme o *cis*-přirozených protismyslných transkriptech, které rovněž mohou produkovat piRNA a následně regulovat přepis cílových genů [45]. Příkladem *trans* regulace z pseudogenu je regulace genu *Stellate*, který se vyskytuje na chromozomu X. Exprese tohoto genu je u *Drosophila melanogaster* potlačena v důsledku vazby piRNA, jež je produktem pseudogenu vyskytujícího se na chromozomu Y a označovaného jako *SU* nebo *STE*. V případě delece tohoto pseudogenu dochází k přepisu genu pro *Stellate*, akumulaci cílového proteinu a vytvoření krystalické struktury v spermatocytech, což vede k neplodnosti [46]. Regulace genové exprese na post-transkripční úrovni prostřednictvím piRNA byla rovněž popsána i v případě sexuální determinace bource morušového. Tento organizmus má ptačí typ sexuální determinace ZW (samice ZW, samci ZZ) a jediná piRNA derivovaná z pohlavního chromozomu W má feminizující účinek na celý organizmus [47].

Nedávná studie na dvou kmenech *Drosophila melanogaster* prokázala, že začlenění TE do euchromatinového lokusu vede k tvorbě nového dvouvláknového klastru piRNA, z něhož mohou následně vznikat funkční piRNA zamezující expanzi TE prostřednictvím post-transkripční regulace exprese těchto mobilních elementů. Zároveň bylo potvrzeno, že produkce malých RNA vyvolaná inzercí TE může rovněž snižovat expresi přilehlých genů [48]. Tato studie je dalším důkazem toho, že malé RNA asociované s TE hrají významnou roli v regulaci genové exprese, a to nejen u zárodečných buněk.

PIWI proteiny a kancerogeneze

První zmínka o souvislosti mezi proteiny z podrodiny PIWI a nádory se týkala proteinu HIWI, jehož exprese byla prokázána v nádorové tkáni seminomů, avšak nikoliv v příslušné nenádorové tkáni [49]. Na tuto studii navázaly další práce dokumentující deregulovanou expresi proteinu HILI u nádorů prsu, vaječníků a děložního hrdla, zvýšené hladiny proteinu HIWI u nádorů jater a u pacientů se sarkomy či pozměněnou expresi proteinů HIWI a HIWI2 u pacientů s nádory žaludku [50].

Další klinické studie naznačují prognostický potenciál některých PIWI proteinů. U gliomů byla popsána pozitivní korelace mezi expresí proteinu HIWI a gradem onemocnění, přičemž pacienti s vysokou hladinou tohoto proteinu měli významně horší prognózu [51]. Následující studie dokumentují úzkou souvislost mezi hladinami proteinu HIWI a vybranými klinicko-patologickými znaky pacientů s nádory slinivky břišní, tlustého střeva a konečníku, endometria, jícnu, jater a žaludku [50]. V případě pacientů s nádory žaludku byla prokázána přímá korelace mezi expresí proteinů HIWI, HILI, PIWIL3 i HIWI2 a klinickým stadiem onemocnění. Zároveň bylo zjištěno, že pacienti se zvýšenými hladinami těchto proteinů mají kratší dobu celkového přežívání [52].

Konkrétní zapojení PIWI proteinů do procesů kancerogeneze zatím není objasněno, avšak na základě dosavadních studií na animálních modelech *Mus Musculus* a *Drosophila melanogaster* [19,53] existuje několik možných vy-

světlení. Jednou z hypotéz je, že zvýšená exprese těchto proteinů přispívá ke vzniku a progresi nádorových onemocnění prostřednictvím epigenetického umlčování nádorově supresorových genů na transkripční úrovni. Další možností je pak jejich zapojení do umlčování TE [54] či regulace genové exprese prostřednictvím metylace histonů, o čemž svědčí také jejich společný výskyt se skupinou proteinů Polycomb, které jsou známé svou schopností remodelovat chromatin [55]. PIWI proteiny mohou dále fungovat jako aktivátory transkripce prostřednictvím zavádění euchromatických histonových modifikací do oblastí heterochromatinu [56]. V souladu s pozorovanými epigenetickými funkcemi komplexů PIWI/piRNA bylo dále popsáno, že exprese proteinů HIWI koreluje s mírou metylace u pacientů se sarkomy, přičemž snížené hladiny tohoto proteinu byly nalezeny ve tkáních s globální hypometylací DNA a souvisely s prognosticky příznivějším onemocněním [57].

Deregulovaná exprese piRNA u nádorových onemocnění

Vzhledem ke skutečnosti, že se piRNA významně podílejí na regulaci exprese genů a udržování genomové stability, předpokládá se jejich zapojení do procesů kancerogeneze [58]. Přestože v souvislosti s nádory byly nejprve zkoumány pouze jednotlivé PIWI proteiny, prvotní studie již prokázaly význam konkrétních piRNA v patogenezi nádorových onemocnění [50]. Tyto molekuly se podobně jako miRNA mohou podílet na regulaci exprese klíčových nádorových supresorů či onkogenů, a to především prostřednictvím vazby k cílovým mRNA, jež v 3' nepřekládané oblasti obsahují transpozonnální sekvence. Kromě toho narušení fyziologických hladin piRNA, které za normálních okolností potlačují aktivitu TE, může ulehčit retrotranspozici, zvýšit genomovou nestabilitu, a přispět tak ke vzniku či progresi nádorového onemocnění. Přestože dosavadní studie dokumentují celkovou deregulaci hladin piRNA v nádorové tkáni, přesné funkce těchto molekul nebyly dosud objasněny. Zároveň není známo, zda k této deregulaci dochází v důsledku přítomnosti ná-

Tab. 1. Přehled piRNA s deregulovanou expresí v nádorové tkáni pacientů s nádorovým onemocněním.

Nádorové onemocnění	Deregulovaná piRNA	Funkce piRNA	Reference
nádory žaludku	piR-823 ↓	vliv na proliferaci, bez korelace s klinicko-patologickými znaky pacientů, předpokládá se role v prekanceróze	[59]
	piR-651 ↑	vliv na proliferaci nádorových buněk, regulace buněčného cyklu	[64]
	piR-59056 ↑ piR-32105 ↑ piR-58099 ↑		[77]
nádory jater	piR-Hep1 ↑	v komplexu s PIWIL2, vliv na viabilitu a invazivitu buněk, tlumí expresi AKT	[63]
nádory slinivky břišní	piR-17061 ↓	lokalizace v HBII-296A snoRNA	[78]
nádory plic	piR-L-163 ↓	součást intronu genu <i>LAMC2</i> , vliv na regulaci buněčného cyklu, proliferaci, viabilitu, migraci a syntézu DNA	[79]
nádory prsu	piR-4987 ↑	korelace s přítomností metastáz v RLU	[65]
nádory ledvin	piR-38756 ↓ piR-57125 ↓ piR-30924 ↓		[80]
	piR-32051 ↑ piR-39894 ↑ piR-43607 ↑	piRNA klastr na chromozomu 17, korelace s přítomností metastáz, stadiem onemocnění a přežíváním pacientů	[81]
	piR-823 ↓		[60]
nádory močového měchýře	piR-60152 ↓	vliv na proliferaci, apoptózu, klonogenicitu	[64]
mnohočetný myelom	piR-823 ↑	korelace s prognózou, vliv na apoptózu, proliferaci, buněčný cyklus a angiogenezi, regulace DNMT3A/B	[24]

RLU – regionální lymfatické uzliny, DNMT3A/B – DNA metyltransferáza 3A/B

dorových buněk, nebo ještě před samotným vznikem onemocnění.

Jednou z nejvíce studovaných piRNA u pacientů s nádory je piR-823. Snížené hladiny této piRNA byly zaznamenány u nádorů žaludku [59] či u pacientů s renálním karcinomem [60], přičemž umělé navýšení hladiny piR-823 *in vitro* v buněčné linii odvozené od nádoru žaludku vedlo k významné inhibici růstu nádorových buněk. Nádorově supresorový efekt této piRNA byl následně potvrzen *in vivo* s využitím myšího modelu [61]. K opačným výsledkům dospěla studie zabývající se expresí piR-823 u mnohočetného myelomu. Hlavní příčinou rozvoje tohoto onemocnění je hypermetylace DNA vedoucí k potlačení transkripce nádorově supresorových genů. V tomto případě byla exprese piR-823 zvýšená jak u pacientů s mnohočetným myelomem, tak ve stabilních buněčných liniích

odvozených od tohoto typu nádoru. Zvýšené hladiny zároveň pozitivně korelovaly s klinickým stadiem onemocnění. Umlčení piR-823 pomocí syntetických oligonukleotidů vedlo k zástavě buněčného cyklu a k expresi proteinů indukujících apoptózu. Autoři této studie tedy předpokládají, že piR-823 funguje jako významný onkogen u pacientů s mnohočetným myelomem, a mohla by proto v budoucnu sloužit jako slibný terapeutický cíl [62]. Tyto výsledky naznačují, že jednotlivé piRNA mohou podobně jako miRNA vystupovat v procesu kancerogeneze buď jako onkogeny, nebo jako nádorově supresory v závislosti na typu nádorového onemocnění a okolním mikroprostředí.

V případě hepatocelulárního karcinomu byla identifikována piR-Hep1, jež byla ve zvýšené míře exprimována v nádorové tkáni necelých 50 %

pacientů a jejíž umlčení v nádorových liniích vedlo k inhibici životaschopnosti buněk a snížení jejich pohyblivosti [63]. Cheng et al [64] se ve své práci zabývají piR-651, jež je ve zvýšené míře exprimována u pacientů s nádory žaludku, tračníku, prsu a plic, a funguje tedy pravděpodobně jako významný nádorový onkogen. V nádorové tkáni močového měchýře byla identifikována piR-60152, jejíž exprese byla významně snížena u pacientů s tímto onemocněním. Zvýšení hladin této piRNA ve stabilních buněčných liniích pomocí tranzientní transfekce vedlo k snížené proliferaci, indukci apoptózy a k poklesu klonogenního potenciálu buněk [65].

Deregulovaná exprese piRNA byla popsána i u pacientů s nádory prsu. Huang et al [66] identifikovali zvýšenou expresi pěti piRNA v nádorové tkáni pacientů, přičemž piR-4987 byla aso-

ciována s přítomností metastáz v regionálních lymfatických uzlinách, a mohla by proto sloužit jako slibný prognostický marker. Nedávné studie dále prokázaly, že přibližně 40 % piRNA exprimovaných u pacientů s nádory prsu má intragenový původ. Předpokládá se tedy, že transkripty některých genů by mohly sloužit jako prekurzory piRNA a zároveň by jejich exprese mohla být prostřednictvím těchto piRNA zpětně regulována. Dalším zajímavým zjištěním je pak skutečnost, že transkripce genů pro některé piRNA je závislá na estrogenu a na transkripčním faktoru Erβ. Expresí tří piRNA (DQ597945, DQ570994 a DQ598651) je odlišná u buněk s estrogenovým receptorem a u buněk bez tohoto receptoru. Tyto výsledky naznačují, že by piRNA mohly sloužit jako významné prediktivní biomarkery u pacientů s nádory prsu [67].

Expresním profilováním piRNA v somatických nádorových buňkách se zabývala studie Martineze et al [68]. Z popisovaných 20 831 piRNA bylo v nemaligních somatických buňkách exprimováno 273 piRNA (1,3 %), zatímco v nádorových buňkách bylo detekováno 522 různých piRNA (2,5 %), což je téměř 2krát více. Na základě exprese konkrétních piRNA pak bylo možné spolehlivě odlišit nádorovou tkáň od nenádorové sliznice, zároveň pak byla prokázána vysoká tkáňová specifita některých piRNA.

Tabulka 1 shrnuje výsledky několika dosavadních studií, jež popisují významnou deregulaci konkrétních piRNA u jednotlivých onkologických diagnóz. Tyto kandidátní piRNA by se po dalších validacích mohly stát slibnými diagnostickými, prognostickými či prediktivními biomarkery u pacientů s nádorovými onemocněními.

Cirkulující piRNA jako nové nádorové biomarkery

Do popředí zájmu se v posledních letech dostaly volně cirkulující piRNA v tělních tekutinách, které nabízejí široké využití pro včasný neinvazivní záchyt nádorových onemocnění [69] a také pro predikci léčebné odpovědi či stanovení prognózy pacientů. Bylo prokázáno, že cirkulující piRNA, podobně jako miRNA, jsou v tělních tekutinách vysoce stabilní a mají schopnost odolávat celé řadě i ex-

trémních fyzikálních vlivů uměle vytvořených v laboratorních podmínkách [70].

Jedním z míst výskytu piRNA je např. nebuněčná frakce lidských slin. Bahn et al [71] detekovali 109 různých piRNA přítomných v lidských slinách, přičemž nejvíce exprimovanou byla piR-018570. Cui et al [72] následně analyzovali expresi piR-823 a piR-651 v periferní krvi pacientů s nádorem žaludku. Obě piRNA byly ve zvýšené míře detekovány v krevním séru zdravých kontrol a mohly by v budoucnu sloužit jako nové markery pro neinvazivní diagnostiku tohoto onemocnění. Autoři zároveň uvádějí, že piR-823 a piR-651 jsou citlivějšími indikátory karcinomu žaludku než miR-106a a miR-17, které byly dosud popisovány jako vhodné diagnostické biomarkery těchto nádorů [73]. Na základě exprese piR-823 a piR-651 bylo dále možné zachytit časná stadia onemocnění, a to s vyšší senzitivitou a specificitou, než jakou nabízejí současně používané markery CEA (karcinoembryonální antigen) a CA 19-9 [74].

PiRNA jako nové terapeutické cíle

Identifikace interakčních partnerů piRNA a pochopení principu těchto interakcí nejenže významně rozšíří poznání v oblasti nádorové biologie, ale představuje potenciálně velice slibný terapeutický přístup u nádorových onemocnění. Použití synteticky vyrobených piRNA pro blokaci syntézy cílových proteinů prostřednictvím vazby na mRNA bez nutnosti využití enzymu Dicer je zvažováno jako potenciální terapeutická aplikace. Předpokládá se, že jednou z výhod piRNA jako terapeutického cíle je vysoká specifita (na rozdíl od miRNA). V léčbě by mohly být rovněž využívány PIWI antigeny pro doručení léčiv do míst nádoru [75]. Mezi další výhody piRNA jako potenciálního terapeutického cíle patří účast na degradaci RNA na post-transkripční úrovni a schopnost metylace DNA vedoucí k umlčování genů a inhibici exprese určitých onkogenů [76].

Závěr

Nedávno objevená třída krátkých nekodujících RNA označovaných jako piRNA se stává předmětem výzkumu v mnoha oblastech biologie, vč. biologie nádorové.

Tento přehledový článek shrnuje základní poznatky týkající se biogeneze piRNA a mechanismů jejich funkčního uplatnění v rámci udržování stability genomu. Skutečnost, že piRNA jsou schopné epigeneticky kontrolovat expresi genů a jsou hojně a specificky exprimované ve všech lidských tkáních, jsou hlavními důvody, pro které se staly předmětem biomedicínského výzkumu. V současnosti již víme, že hladiny některých piRNA jsou v nádorové tkáni významně deregulované v porovnání s tkání nenádorovou. Zatím však není zcela jasné, zda tato deregulace vede ke vzniku a progresi onemocnění nebo je spíše důsledkem změn, jež kancerogenezi provázejí. Zatímco některé studie poukazují na skutečnost, že piRNA umlčují expresi nádorových supresorů na transkripční i post-transkripční úrovni, a tím přispívají ke vzniku nádoru, jiné studie předpokládají, že v důsledku globálně snížených hladin piRNA v organismu dochází k nedostatečné inhibici transkripce některých onkogenů, jejichž exprese je následně zodpovědná za rozvoj nádorového onemocnění. Lepší porozumění biologické funkce těchto molekul by v budoucnu mohlo vést k jejich možnému využití v terapii nádorových onemocnění a ke zdokonalení molekulární typizace nádorů. Velkým příslibem do budoucna jsou rovněž volně cirkulující piRNA přítomné v tělních tekutinách, jež by mohly představovat slibné biomarkery pro časnou neinvazivní diagnostiku a zároveň by mohly přispět k lepší stratifikaci pacientů na základě prognózy či předpokládané léčebné odpovědi.

Poděkování

Autoři děkují Mgr. Andrejovi Bešše za přípravu ilustrací pro publikaci.

Literatura

1. Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
2. Sabin LR, Delás MJ, Hannon GJ. Dogma derailed: the many influences of RNA on the genome. *Mol Cell* 2013; 49(5): 783–794. doi: 10.1016/j.molcel.2013.02.010.
3. Baylin SB, Jones PA. A decade of exploring the cancer epigenome – biological and translational implications. *Nat Rev Cancer* 2011; 11(10): 726–734. doi: 10.1038/nrc3130.
4. Luteijn MJ, Ketting RF. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat Rev Genet* 2013; 14(8): 523–534. doi: 10.1038/nrg3495.

5. Sana J, Faltejškova P, Svoboda M et al. Novel classes of non-coding RNAs and cancer. *J Transl Med* 2012; 10: 103. doi: 10.1186/1479-5876-10-103.
6. Chinwalla AT, Cook LL, Delehaunty KD et al. Initial sequencing and comparative analysis of the mouse genome. *Nature* 2002; 420(6915): 520–562.
7. Slotkin RK, Martienssen R. Transposable elements and the epigenetic regulation of the genome. *Nat Rev Genet* 2007; 8(4): 272–285.
8. Goodier JL, Kazazian HH. Retrotransposons revisited: the restraint and rehabilitation of parasites. *Cell* 2008; 135(1): 23–35. doi: 10.1016/j.cell.2008.09.022.
9. Lim RS, Kai T. A piece of the pi(e): the diverse roles of animal piRNAs and their PIWI partners. *Semin Cell Dev Biol* 2015; 47–48: 17–31. doi: 10.1016/j.semcdb.2015.10.025.
10. Höck J, Meister G. The Argonaute protein family. *Genome Biol* 2008; 9(2): 210. doi: 10.1186/gb-2008-9-2-210.
11. Kim VN, Han J, Siomi MC. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2009; 10(2): 126–139. doi: 10.1038/nrm2632.
12. Parker JS, Barford D. Argonaute: a scaffold for the function of short regulatory RNAs. *Trends Biochem Sci* 2006; 31(11): 622–630.
13. Zhai L, Wang L, Teng F et al. Argonaute and argonaute-bound small RNAs in stem cells. *Int J Mol Sci* 2016; 17(2): 208. doi: 10.3390/ijms17020208.
14. Ku HY, Lin H. PIWI proteins and their interactors in piRNA biogenesis, germline development and gene expression. *Nat Sci Rev* 2014; 1(2): 205–218.
15. Aravin A, Gaidatzis D, Pfeffer S et al. A novel class of small RNAs bind to MILI protein in mouse testes. *Nature* 2006; 442(7099): 203–207.
16. Girard A, Sachidanandam R, Hannon GJ et al. A germline-specific class of small RNAs binds mammalian Piwi proteins. *Nature* 2006; 442(7099): 199–202.
17. Pane A, Wehr K, Schüpbach T. Zucchini and squash encode two putative nucleases required for rasiRNA production in the *Drosophila* germline. *Dev Cell* 2007; 12(6): 851–862.
18. Rengaraj D, Lee S, Park T et al. Small non-coding RNA profiling and the role of piRNA pathway genes in the protection of chicken primordial germ cells. *BMC Genomics* 2014; 15: 757. doi: 10.1186/1471-2164-15-757.
19. Aravin AA, Sachidanandam R, Bourc'his D et al. A piRNA pathway primed by individual transposons is linked to de novo DNA methylation in mice. *Mol Cell* 2008; 31(6): 785–799. doi: 10.1016/j.molcel.2008.09.003.
20. Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K et al. DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 2008; 22(7): 908–917. doi: 10.1101/gad.1640708.
21. Pezic D, Manakov SA, Sachidanandam R et al. piRNA pathway targets active LINE1 elements to establish the repressive H3K9me3 mark in germ cells. *Genes Dev* 2014; 28(13): 1410–1428. doi: 10.1101/gad.240895.114.
22. Rajasethupathy P, Antonov I, Sheridan R et al. A role for neuronal piRNAs in the epigenetic control of memory-related synaptic plasticity. *Cell* 2012; 149(3): 693–707. doi: 10.1016/j.cell.2012.02.057.
23. Lee EJ, Banerjee S, Zhou H et al. Identification of piRNAs in the central nervous system. *RNA* 2011; 17(6): 1090–1099. doi: 10.1261/ra.2565011.
24. Yan Z, Hu HY, Jiang X et al. Widespread expression of piRNA-like molecules in somatic tissues. *Nucleic Acids Res* 2011; 39(15): 6596–6607. doi: 10.1093/nar/gkr298.
25. Houwing S, Kamminga LM, Berezikov E et al. A role for Piwi and piRNAs in germ cell maintenance and transposon silencing in Zebrafish. *Cell* 2007; 129(1): 69–82.
26. Khurana JS, Theurkauf W. piRNAs, transposon silencing, and *Drosophila* germline development. *J Cell Biol* 2010; 191(5): 905–913. doi: 10.1083/jcb.201006034.
27. Brennecke J, Aravin AA, Stark A et al. Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in *Drosophila*. *Cell* 2007; 128(6): 1089–1103.
28. Goh WS, Seah JW, Harrison EJ et al. A genome-wide RNAi screen identifies factors required for distinct stages of *C. elegans* piRNA biogenesis. *Genes Dev* 2014; 28(7): 797–807. doi: 10.1101/gad.235622.113.
29. Khurana JS, Theurkauf W. piRNAs, transposon silencing, and *Drosophila* germline development. *J Cell Biol* 2010; 191(5): 905–913. doi: 10.1083/jcb.201006034.
30. Ishizu H, Siomi H, Siomi MC. Biology of PIWI-interacting RNAs: new insights into biogenesis and function inside and outside of germlines. *Genes Dev* 2012; 26(21): 2361–2373. doi: 10.1101/gad.203786.112.
31. Czech B, Hannon GJ. One loop to rule them all: the ping-pong cycle and piRNA-guided silencing. *Trends Biochem Sci* 2016; 41(4): 324–337. doi: 10.1016/j.tibs.2015.12.008.
32. Luteijn MJ, Ketting RF. PIWI-interacting RNAs: from generation to transgenerational epigenetics. *Nat Rev Genet* 2013; 14(8): 523–534. doi: 10.1038/nrg3495.
33. Ketting RF. The many faces of RNAi. *Dev Cell* 2011; 20(2): 148–161. doi: 10.1016/j.devcel.2011.01.012.
34. Guzzardo PM, Muerdter F, Hannon GJ. The piRNA pathway in flies: highlights and future directions. *Curr Opin Genet Dev* 2013; 23(1): 44–52. doi: 10.1016/j.gde.2012.12.003.
35. Siomi MC, Sato K, Pezic D et al. PIWI-interacting small RNAs: the vanguard of genome defence. *Nat Rev Mol Cell Bio* 2011; 12(4): 246–258. doi: 10.1038/nrm3089.
36. Kuramochi-Miyagawa S, Kimura T, Yomogida K et al. Two mouse piwi-related genes: miwi and mili. *Mech Dev* 2001; 108(1–2): 121–133.
37. Reuter M, Chuma S, Tanaka T et al. Loss of the Mili-interacting tudor domain-containing protein-1 activates transposons and alters the Mili-associated small RNA profile. *Nat Struct Mol Biol* 2009; 16(6): 639–646. doi: 10.1038/nsmb.1615.
38. Sienski G, Dönertas D, Brennecke J. Transcriptional silencing of transposons by Piwi and maelstrom and its impact on chromatin state and gene expression. *Cell* 2012; 151(5): 964–980. doi: 10.1016/j.cell.2012.10.040.
39. Le Thomas A, Rogers AK, Webster A et al. Piwi induces piRNA-guided transcriptional silencing and establishment of a repressive chromatin state. *Genes Dev* 2013; 27(4): 390–399. doi: 10.1101/gad.209841.112.
40. Bagijn MP, Goldstein LD, Sapetschnig A et al. Function, targets, and evolution of caenorhabditis elegans piRNAs. *Science* 2012; 337(6094): 574–578. doi: 10.1126/science.1220952.
41. Ashe A, Sapetschnig A, Weick EM et al. piRNAs can trigger a multigenerational epigenetic memory in the germline of *C. elegans*. *Cell* 2012; 150(1): 88–99. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.018.
42. Shirayama M, Seth M, Lee HC et al. piRNAs initiate an epigenetic memory of nonself RNA in the *C. elegans* germline. *Cell* 2012; 150(1): 65–77. doi: 10.1016/j.cell.2012.06.015.
43. Faulkner GJ, Kimura Y, Daub CO et al. The regulated retrotransposon transcriptome of mammalian cells. *Nat Genet* 2009; 41(5): 563–571. doi: 10.1038/ng.368.
44. Lim AK, Lorthongpanich C, Chew TG et al. The nuage mediates retrotransposon silencing in mouse primordial ovarian follicles. *Development* 2013; 140(18): 3819–3825. doi: 10.1242/dev.099184.
45. Watanabe T, Lin H. Posttranscriptional regulation of gene expression by Piwi proteins and piRNAs. *Mol Cell* 2014; 56(1): 18–27. doi: 10.1016/j.molcel.2014.09.012.
46. Kotelnikov RN, Klenov MS, Rozovsky YM et al. Peculiarities of piRNA-mediated post-transcriptional silencing of Stellate repeats in testes of *Drosophila melanogaster*. *Nucleic Acids Res* 2009; 37(10): 3254–3263. doi: 10.1093/nar/gkp167.
47. Kiuchi T, Koga H, Kawamoto M et al. A single female-specific piRNA is the primary determinant of sex in the silkworm. *Nature* 2014; 509(7502): 633–636. doi: 10.1038/nature13315.
48. Shpiz S, Ryazansky S, Olovnikov I et al. Euchromatic transposon insertions trigger production of novel Pi- and Endo-siRNAs at the target sites in the *Drosophila* germline. *PLoS Genet* 2014; 10(2): e1004138. doi: 10.1371/journal.pgen.1004138.
49. Qiao D, Zeeman AM, Deng W et al. Molecular characterization of hiwi, a human member of the piwi gene family whose overexpression is correlated to seminomas. *Oncogene* 2002; 21(25): 3988–3999.
50. Suzuki R, Honda S, Kirino Y. PIWI expression and function in cancer. *Front Genet* 2012; 3: 204. doi: 10.3389/fgene.2012.00204.
51. Sun G, Wang Y, Sun L et al. Clinical significance of Hiwi gene expression in gliomas. *Brain Res* 2011; 1373: 183–188. doi: 10.1016/j.brainres.2010.11.097.
52. Wang Y, Liu Y, Shen X et al. The PIWI protein acts as a predictive marker for human gastric cancer. *Int J Clin Exp Pathol* 2012; 5(4): 315–325.
53. Saito K, Nishida KM, Mori T et al. Specific association of Piwi with rasiRNAs derived from retrotransposon and heterochromatic regions in the *Drosophila* genome. *Genes Dev* 2006; 20(16): 2214–2222.
54. Cox DN, Chao A, Baker J et al. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev* 1998; 12(23): 3715–3727.
55. Grimaud C, Bantignies F, Pal-Bhadra M et al. RNAi components are required for nuclear clustering of Polycomb group response elements. *Cell* 2006; 124(5): 957–971.
56. Yin H, Lin H. An epigenetic activation role of Piwi and a Piwi-associated piRNA in *Drosophila melanogaster*. *Nature* 2007; 450(7167): 304–308.
57. Siddiqi S, Matushansky I. Piwis and piwi-interacting RNAs in the epigenetics of cancer. *J Cell Biochem* 2012; 113(2): 373–380. doi: 10.1002/jcb.23363.
58. Esteller M. Non-coding RNAs in human disease. *Nat Rev Genet* 2011; 12(12): 861–874. doi: 10.1038/nrg3074.
59. Cheng J, Deng H, Xiao B et al. piR-823, a novel non-coding small RNA, demonstrates in vitro and in vivo tumor suppressive activity in human gastric cancer cells. *Cancer Lett* 2012; 315(1): 12–17. doi: 10.1016/j.canlet.2011.10.004.
60. Iliiev R, Stanik M, Fedorko M et al. Decreased expression levels of PIWIL1, PIWIL2, and PIWIL4 are associated with worse survival in renal cell carcinoma patients. *Oncotargets Ther* 2016; 9: 217–222. doi: 10.2147/OTT.591295.
61. Iliiev R, Fedorko M, Machackova T et al. Expression levels of PIWI-interacting RNA piR-823 are deregulated in tumor tissue blood serum and urine of patients with renal cell carcinoma. *Anticancer Res* 2016; 36(12): 6419–6423.
62. Yan H, Wu QL, Sun CY et al. piRNA-823 contributes to tumorigenesis by regulating de novo DNA methylation and angiogenesis in multiple myeloma. *Leukemia* 2015; 29(1): 196–206. doi: 10.1038/leu.2014.135.
63. Cuiyun Y, Ning Q, Li ZP et al. Non-coding RNAs: new therapeutic targets and opportunities for hepatocellular carcinoma. *Adv Mod Oncol Res* 2016; 2(1): 5–17.
64. Cheng J, Guo JM, Xiao BX et al. piRNA, the new non-coding RNA, is aberrantly expressed in human cancer cells. *Clin Chim Acta* 2011; 412(17–18): 1621–1625. doi: 10.1016/j.cca.2011.05.015.
65. Chu H, Hui G, Yuan L et al. Identification of novel piRNAs in bladder cancer. *Cancer Lett* 2015; 356(2): 561–567. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.004.
66. Huang G, Hu H, Xue X et al. Altered expression of piRNAs and their relation with clinicopathologic features of breast cancer. *Clin Transl Oncol* 2013; 15(7): 563–568. doi: 10.1007/s12094-012-0966-0.
67. Hashim A, Rizzo F, Marchese G et al. RNA sequencing identifies specific PIWI-interacting small non-coding RNA expression patterns in breast cancer. *Oncotarget* 2014; 5(20): 9901–9910.
68. Martinez VD, Enfield KS, Rowbotham DA et al. An atlas of gastric PIWI-interacting RNA transcriptomes and their utility for identifying signatures of gastric can-

cer recurrence. *Gastric Cancer* 2016; 19(2): 660–665. doi: 10.1007/s10120-015-0487-y.

69. Kishikawa T, Otsuka M, Ohno M et al. Circulating RNAs as new biomarkers for detecting pancreatic cancer. *World J Gastroenterol* 2015; 21(28): 8527–8540. doi: 10.3748/wjg.v21.i28.8527.

70. Yang X, Cheng Y, Lu Q et al. Detection of stably expressed piRNAs in human blood. *Int J Clin Exp Med* 2015; 8(8): 13353–13358.

71. Bahn JH, Zhang Q, Li F et al. The landscape of microRNA, Piwi-interacting RNA, and circular RNA in human saliva. *Clin Chem* 2015; 61(1): 221–230. doi: 10.1373/clinchem.2014.230433.

72. Cui L, Lou Y, Zhang X et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using piRNAs as markers. *Clin Biochem* 2011; 44(13): 1050–1057. doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.06.004.

73. Zhou H, Guo JM, Lou YR et al. Detection of circulating tumor cells in peripheral blood from patients with gastric cancer using microRNA as a marker. *J Mol Med* 2010; 88(7): 709–717. doi: 10.1007/s00109-010-0617-2.

74. Li PF. Non-coding RNAs and gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2014; 20(18): 5411–5419. doi: 10.3748/wjg.v20.i18.5411.

75. Assumpção CB, Calcagno DQ, Araújo TM et al. The role of piRNA and its potential clinical implications in cancer. *Epigenomics* 2015; 7(6): 975–984. doi: 10.2217/epi.15.37.

76. Mei Y, Clark D, Mao L. Novel dimensions of piRNAs in cancer. *Cancer Lett* 2013; 336(1): 46–52. doi: 10.1016/j.canlet.2013.04.008.

77. Martinez VD, Vucic EA, Thu KL et al. Unique somatic and malignant expression patterns implicate PIWI-interacting RNAs in cancer-type specific biology. *Sci Rep* 2015; 5: 10423. doi: 10.1038/srep10423.

78. Müller S, Raulefs S, Bruns P et al. Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer. *Mol Cancer* 2015; 14(1): 94. doi: 10.1186/s12943-015-0358-5.

79. Mei YP, Liao JP, Shen J et al. Small nucleolar RNA 42 acts as an oncogene in lung tumorigenesis. *Oncogene* 2012; 31(22): 2794–2804. doi: 10.1038/onc.2011.449.

80. Busch J, Ralla B, Jung M et al. Piwi-interacting RNAs as novel prognostic markers in clear cell renal cell carcinomas. *J Exp Clin Cancer Res* 2015; 34(1): 61. doi: 10.1186/s13046-015-0180-3.

81. Li Y, Wu X, Gao H et al. Piwi-interacting RNAs (piRNAs) are dysregulated in renal cell carcinoma and associated with tumor metastasis and cancer-specific survival. *Mol Med Camb Mass* 2015; 21(1): 381–388. doi: 10.2119/molmed.2014.00203.

Redakce časopisu *Klinická onkologie* a nakladatelství *Ambit Media, a.s.* vypisuje

SOUTĚŽ NA PODPORU AUTORSKÝCH TÝMŮ PUBLIKUJÍCÍCH V ZAHRANIČNÍCH ODBORNÝCH TITULECH

Odměna pro vítěze: 10 000 Kč

Cíl soutěže:

Podpořit renomé a prestiž časopisu *Klinická onkologie* – oficiálního časopisu ČOS ČLS JEP – u domácích i zahraničních autorů, lékařů a akademických pracovníků.

Podmínky soutěže:

1. Soutěž je určena autorským týmům, které publikují v zahraničních odborných titulech.
2. Do soutěže budou zařazeny práce publikované v zahraničních titulech od ledna do prosince 2016.
3. Ve svých článcích zaslanych k publikaci do zahraničního periodika budou autoři citovat práci, která byla otištěna v časopise *Klinická onkologie* (k vyhledání lze použít databáze www.pubmed.org nebo www.linkos.cz).
4. Do soutěže nebudou zařazeny autocitace.
5. Ze všech prací, které splní podmínky soutěže, bude redakční radou vylosována jedna, jejíž autorský tým bude oceněn částkou 10 000 Kč.

**KLINICKÁ
ONKOLOGIE**


ambit media®