

Dlouhé nekódující RNA – současné možnosti detekce a využití v klinické praxi

Long Non-Coding RNAs – Current Methods of Detection and Clinical Applications

Moráňová L., Bartošík M.

Regionální centrum aplikované molekulární onkologie, Masarykův onkologický ústav, Brno

Souhrn

Východiska: Dlouhé nekódující RNA (long non-coding RNA – lncRNA) jsou RNA molekuly o délce větší než 200 nukleotidů, které ovlivňují řadu fyziologických funkcí a mají významnou regulační roli v buňkách. Jejich hladiny jsou často změněny u různých malignit, a představují tak slibný biomarker pro diagnostiku, prognózu nebo rekurenci nádorových onemocnění. Díky důležitosti těchto molekul výrazně roste i počet publikací na toto téma. Mezi nejčastěji studované lncRNA patří např. HOTAIR, MALAT1 a PCA3. **Cíl:** V současné době jsou vyvíjeny různé metody pro analýzu či detekci lncRNA, obvykle založené na optických metodách pro detekci mediátorové RNA (mRNA), např. polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí, fluorescenční *in situ* hybridizace nebo sekvenování nové generace. Je však potřeba dbát na rozdíly ve struktuře mRNA a lncRNA. V této práci popisujeme nejenom standardní metody, ale i nové přístupy pro detekci lncRNA zahrnující např. chemiluminescenční a elektrochemické techniky. **Závěr:** I navzdory pokrokům a velkému množství publikovaných prací existuje pouze jeden schválený diagnostický test založený na detekci lncRNA, a to PCA3 test pro diagnostiku karcinomu prostaty analýzou moči. Ostatní jsou v současnosti pouze ve fázi vývoje a bude potřeba je validovat. Diagnostika založená na lncRNA i tak skýtá obrovský potenciál, a je proto velmi pravděpodobné, že se v blízké době objeví další diagnostické testy cílicí na jiné typy lncRNA.

Klíčová slova

dlouhá nekódující RNA – nádorové biomarkery – karcinogeneze – biosenzory

Summary

Background: Long non-coding RNAs (lncRNA) are more than 200-nucleotide-long RNA molecules that affect multiple physiologic phenomena and have important regulatory functions in cells. Their levels are often altered in various malignancies, thus they represent a potential biomarker for the diagnostics, prognosis or recurrence of cancer. Their importance has recently led to an enormous increase in a number of publications on the subject. The most frequently studied lncRNAs are HOTAIR, MALAT1 and PCA3. **Aim:** Numerous methods are currently being developed for the analysis or detection of lncRNA. They are mostly based on optical methods used for the detection of messenger RNAs, including polymerase chain reaction with reverse transcription, fluorescence *in situ* hybridisation or next-generation sequencing, but caution must be taken due to their structural differences. Here, we describe not only standard but also novel techniques for lncRNA detection, including chemiluminescent and electrochemical techniques. **Conclusion:** Despite the great progress and plethora of papers on this topic, there is only one single approved lncRNA-based diagnostic test, a PCA3 test for the diagnosis of prostate cancer from the patient's urine. All other tests are only in their research phase and need to be validated. Nevertheless, lncRNA diagnostics offer enormous potential and thus it is highly probable that other diagnostic tests on different lncRNA types will soon appear.

Key words

long non-coding RNA – tumor biomarkers – carcinogenesis – biosensing techniques

Práce byla podpořena projekty MŠMT – NPU I – LO1413 a GAČR 17-08971S.

This work was supported by MEYS – NPS I – LO1413 and Czech Science Foundation 17-08971S.

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.



Mgr. Martin Bartošík, Ph.D.
Regionální centrum aplikované
molekulární onkologie
Masarykův onkologický ústav
Žlutý kopec 7
656 53 Brno
e-mail: martin.bartosik@mou.cz

Obdrženo/Submitted: 28. 5. 2019

Přijato/Accepted: 30. 7. 2019

doi: 10.14735/amko20193565

Úvod

I když pouze 2 % lidského genomu tvoří geny kódující proteiny, velká většina genomu (> 70 %) je transkripčně aktivní, dávající vznik různým formám tzv. nekódujících RNA s významnými regulačními funkcemi [1,2]. Mezi ně patří krátké nekódující RNA o délce menší než 200 nukleotidů (nt, obvykle kolem 20–30 nt), zejména mikroRNA, malé interferující RNA nebo Piwi-interagující RNA a též rozsáhlá skupina tzv. dlouhých nekódujících RNA (long non-coding RNA – lncRNA) o délce větší než 200 nt (často až 100 000 nt). Dle NONCODE databáze [3] se v lidském genomu nachází více než 96 000 genů pro lncRNA a až 172 000 transkriptů těchto genů; naopak LNCipedia [4] udává střízlivější odhad, zaokrouhlený na cca 55 000 genů [5]. Tyto geny se nacházejí v různých oblastech genomu, a to jak v nekódujících regionech, tak i v intronech genů kódujících proteiny. Navíc mohou být prepisovány nejenom ze stejného řetězce jako protein-kódující geny (tzv. „sense“ transkripty), ale i z řetězce opačného („antisense“ transkripty), či dokonce mohou sdílet promotor s protein-kódujícím genem v opačném řetězci (divergentní lncRNA). Transkripty lncRNA jsou obvykle generovány RNA polymerázou II, obdobně jako mRNA mají většinou na 5'-konci metylguanozinovou čepičku, na 3'-konci poly(A) konec a podstupují sestřih. Na rozdíl od mRNA ovšem postrádají otevřený čtecí rámec, takže nemohou být překládány do proteinů.

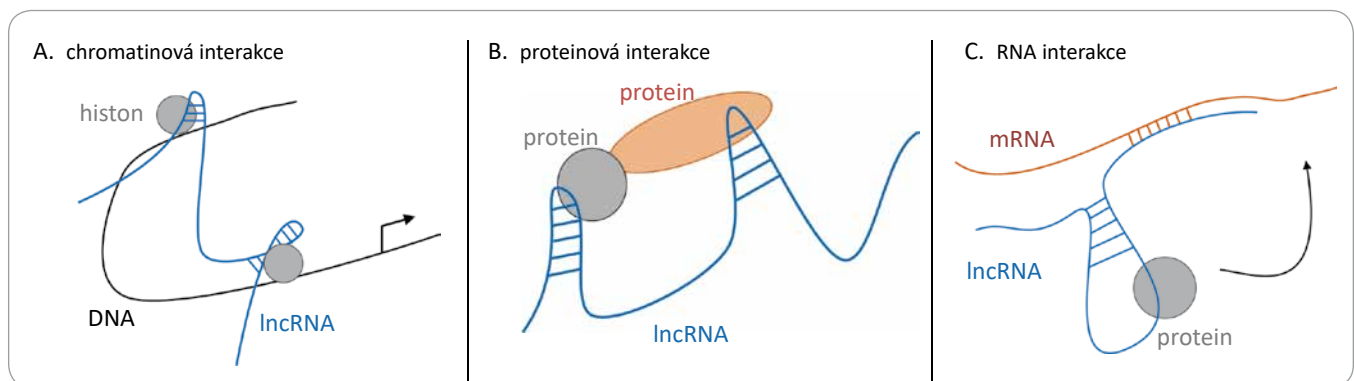
Geny kódující lncRNA jsou často pojmenovány dle sousedících protein-kódujících genů [6]. Jejich klasifikace je relativně složitá, dají se dělit např. dle umístění v genomu, způsobu aktivace nebo dle mechanismu účinku. Hlavní třídy lncRNA, detailněji popsané v přehledném článku Šány et al [7], jsou mj. mezigenové lncRNA (umístěné mezi dvěma geny), intronové lncRNA (umístěné uvnitř intronů genů), lncRNA asociované s telomery nebo pseudogeny (kopie genů neschopné kódovat proteiny). I když funkce většiny lncRNA transkriptů nejsou známy, lze obecně říci, že jejich úloha spočívá v regulaci genové exprese, modulaci proteinové aktivity či remodelaci chromatinu, příp. slouží jako prekurzory krátkých nekódujících RNA nebo jsou součástí systému jejich umlčení [8]. Obr. 1 naznačuje, že mechanismus účinku lncRNA je závislý na vazbě na DNA, RNA nebo protein. Vzhledem k jejich roli při regulaci genové exprese není překvapivé, že při patologických stavech jsou pozorovány změny jejich hladin, které mohou být detekovatelné dříve než viditelné morfologické změny. Tato skutečnost dělá z lncRNA ideální kandidáty nejen na biomarkery nádorových onemocnění [1,7,9–11], ale např. i kardiovaskulárních chorob [12] nebo Alzheimerovy choroby [13]. Díky důležitosti těchto molekul tak roste i počet publikací na toto téma; jenom v roce 2018 jich bylo přes 4 000 (graf 1). Bližší informace o funkci, klasifikaci nebo struktuře několika hlavních skupin

lncRNA je možné najít v článkách publikovaných v dřívějších ročnících Klinické onkologie [7,9]; v tomto článku se chceme zaměřit především na nejnovější poznatky v oblasti metod detekce a jejich aplikace do klinické praxe.

Role lncRNA v karcinogenezi a její aplikace do klinické diagnostiky

Dnes už není pochyb o tom, že deregulace lncRNA je implikována v různých patologických stavech a může vést až k maligní transformaci buněk. Role lncRNA přitom byla prokázána v podstatě u všech charakteristických znaků rakoviny (hallmarks of cancer) definovaných ve dvou dnes již legendárních článkách Hanahana et al [14,15]. Některé konkrétní lncRNA a jejich asociace s těmito znaky jsou blíže popsány v tab. 1. Jde např. o aktivaci proliferčních signálních drah, deregulaci nádorových supresorových drah nebo o účast při metastazování [11,16].

Jednou z nejvíce studovaných lncRNA je HOTAIR (HOX antisense intergenic RNA). Tato lncRNA s délkou cca 2,2 kb reguluje dynamiku chromatinu a ovlivňuje transkripci jiných genů vazbou na histon metylázu PRC2 a histon demethylázu LSD1 [17,18]. Množství studií prokázalo deregulaci HOTAIR v desítkách nádorů, vč. nádorů prsu [19], tlustého střeva [20], slinivky břišní [21], vaječníků [22] nebo prostaty [23]. U nádorů tlustého střeva korelovala zvýšená hladina HOTAIR nejenom s progresí one-



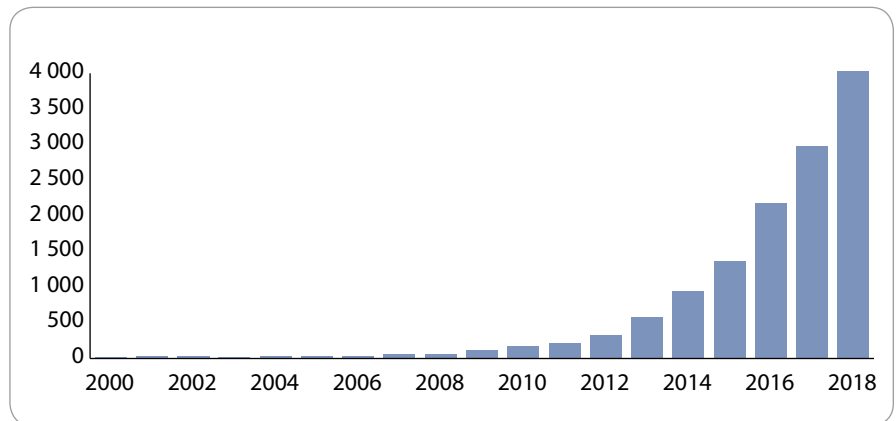
Obr. 1. Tři různé mechanismy působení lncRNA. Jedná se o interakce s: A) chromatinem (DNA), kdy dochází k remodelaci chromatinu po vazbě lncRNA; B) různými proteiny, kde lncRNA může modulovat protein-proteinové interakce; nebo C) mRNA, kde dochází k narušení translace.

lncRNA – dlouhé nekódující RNA, mRNA – mediátorová RNA

mocnění, ale zvýšila se i chemorezistence k cytostatikům [24].

Další diagnosticky zajímavou lncRNA je PCA3 (prostate cancer antigen 3), jejíž hladina je zvýšená u více než 90 % mužů s karcinomem prostaty [25]. V roce 2012 americký Úřad pro kontrolu potravin a léčiv (FDA) schválil použití PCA3 diagnostického testu v moči mužů nad 50 let s předchozí negativní biopsií prostaty, který by tak mohl snížit počet opakovaných biopsií a zároveň poskytnout doplňkové informace ke standardnímu testu prostatického specifického antigenu (prostate specific antigen – PSA). Test na PCA3 má sice nižší citlivost než PSA test, na druhé straně vykazuje vyšší specifitu, a může tak predikovat karcinom prostaty u případů, kdy PSA test selhává [26]. Hladina PCA3 byla ve více než 90 % studovaných případů karcinomu prostaty asi 60–100× vyšší než ve zdravé prostatické tkáni [27] a zároveň nedetekovatelná v jiných typech nádorů [28]. PCA3 také může sloužit jako indikátor agresivity rozvíjejícího se nádoru prostaty [29]. Přes značné výhody tohoto biomarkeru se v ČR toto vyšetření zatím takřka neprovádí.

Některé lncRNA mohou dokonce indikovat metastatický potenciál nádoru. Mezi ně patří např. MALAT1 (metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1), obvykle s vysokou koncentrací v jádře, kde reguluje prometastatické



Graf 1. Nárůst publikační aktivity zabývající se dlouhými nekódujícími RNA od roku 2000 do roku 2018, dle Web of Science (hledaný výraz: lncRNA OR long noncoding RNA).

geny [30]. MALAT1 je vysoce konzervovaná lncRNA, jejíž umlčení vede ke snížení proliferace a migrace nádorových buněk [31] a k aktivaci tumor-supresorového genu *TP53* [32]. U některých typů nádorů byla pozorována zvýšená hladina MALAT1 korelující s progresí metastáz a celkově horší prognózou, např. u plicního adenokarcinomu, kolorektálního karcinomu, karcinomu slinivky břišní, karcinomu močového měchýře, karcinomu jícnu nebo gliomu [1,33–36]. Souhrnná analýza několika nezávislých studií prokázala, že tato lncRNA je spojená s horší prognózou, kratším přežíváním a rekurencí onemocnění [37].

Nicméně data z nedávné studie provedené na myších modelech naznačila, že v prsních nádorových buňkách má MALAT1 opačný, tj. potlačující účinek na vznik metastáz, a autoři tak navrhuji zpřesnění zažitého modelu definující MALAT1 jako prometastatické lncRNA [38].

Další efekt lncRNA je možné pozorovat na úrovni telomer, a to prostřednictvím tzv. TERRA (telomere repeat-containing RNA) molekul, které obsahují telomerové repetice UUAGGG na svém 3'-konci a podílejí se na regulaci telomerové homeostázy [39]. Vzhledem k tomu, že až 85 % lidských nádorů pře-

Tab. 1. Spojitost vybraných lncRNA a charakteristických znaků rakoviny (hallmarks of cancer).

Charakteristický znak	lncRNA	Efekt	Reference
zvýšená proliferace	HOTAIR	aktivace androgenového receptoru	[23]
	CCAT1	aktivace <i>Myc</i> dráhy	[52]
nedostatečná suprese růstu	LED	posiluje tumor supresorovou aktivitu; snížená exprese v nádorech	[53]
rezistence buněčné smrti	LINC00460	inhibuje apoptózu a podporuje progresi kolorektálního karcinomu	[54]
replikační nesmrtelnost	TERRA	možný negativní regulátor telomeráz	[40]
angiogeneze	PVT1	aktivuje dráhu STAT3/VEGFA, podporující angiogenezi	[55]
metastazování	MALAT1	ovlivňuje prometastatické geny; zvýšená hladina při metastázách	[1]
	HOTAIR	zvýšená hladina, horší prognóza	
genová nestabilita	NORAD	přispívá ke genomové stabilitě	[56]
zánět a unikání imunitní odpovědi	NKILA	zvýšená hladina koreluje se zvýšenou buněčnou smrtí T lymfocytů	[57]
změněný metabolismus	MEG3	pozměňuje energetický metabolismus aktivací p53	[58]

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

Tab. 2. Vybrané studie pro validaci lncRNA jako biomarkeru.

lncRNA	Onemocnění	Velikost souboru	Doba trvání (měsíce)	Stát (rok)	Reference
HOTAIR	kolorektální karcinom	157	35	Česká republika (2014)	[59]
HOTAIR	karcinom jícnu	156	–	Čína (2013)	[60]
HOTAIR	karcinom žaludku	300	60	Japonsko (2014)	[61]
HOTAIR	karcinom žaludku	1169	–	Čína (2014)	[62]
PCA3	karcinom prostaty	1913	–	USA (2012)	[63]
PCA3	karcinom prostaty	721	18	Nizozemsko (2010)	[64]
PCA3	karcinom prostaty	633	29	Japonsko (2013)	[65]
MALAT1	karcinom žaludku	150	26	Japonsko (2014)	[61]
MALAT1	nemalobuněčný karcinom plic	225	60	Německo (2003)	[66]
MALAT1	prsní karcinom	509	–	Itálie (2018)	[67]

lncRNA – dlouhé nekódující RNA

koná replikační limit daný délkou telomer (tím, že reaktivují expresi enzymu telomeráza), jeví se regulační role TERRA lncRNA jako zásadní [7]. Sampl et al zjistili, že expresní hladina TERRA negativně koreluje s malignitou gliomů [40]. Přesná role TERRA jakožto negativního regulátoru telomeráz *in vivo* však stále zůstává nejasná [41]. V tab. 2 jsou uvedeny příklady studií využívajících početnější soubory klinických vzorků pro validaci různých druhů lncRNA.

Metody detekce

V současné době existuje pouze jeden lncRNA test schválený pro klinickou diagnostiku, a to výše zmíněný PCA3 test (s názvem ProgenSA PCA3 Assay) od firmy Hologic, využívaný pro diagnostiku karcinomu prostaty. Detekce probíhá v moči po masáži *per rectum*, aby došlo k uvolnění buněk prostaty. Moč je následně modifikována přidáním média, které lyzuje uvolněné buňky a stabilizuje RNA. Princip samotného testu spočívá v hybridizaci cílové RNA na povrch magnetických kuliček, které slouží pro separaci cílové RNA. Dále proběhne reverzní transkripce pomocí první sady primerů a RNA amplifikace pomocí další sady primerů. Dochází tedy nejprve k přepisu lncRNA do komplementární DNA (complementary DNA – cDNA) a dále k její amplifikaci pomocí DNA dependentní RNA polymerázy T7. V závěru jsou RNA amplicony detekovány pomocí chemilumi-

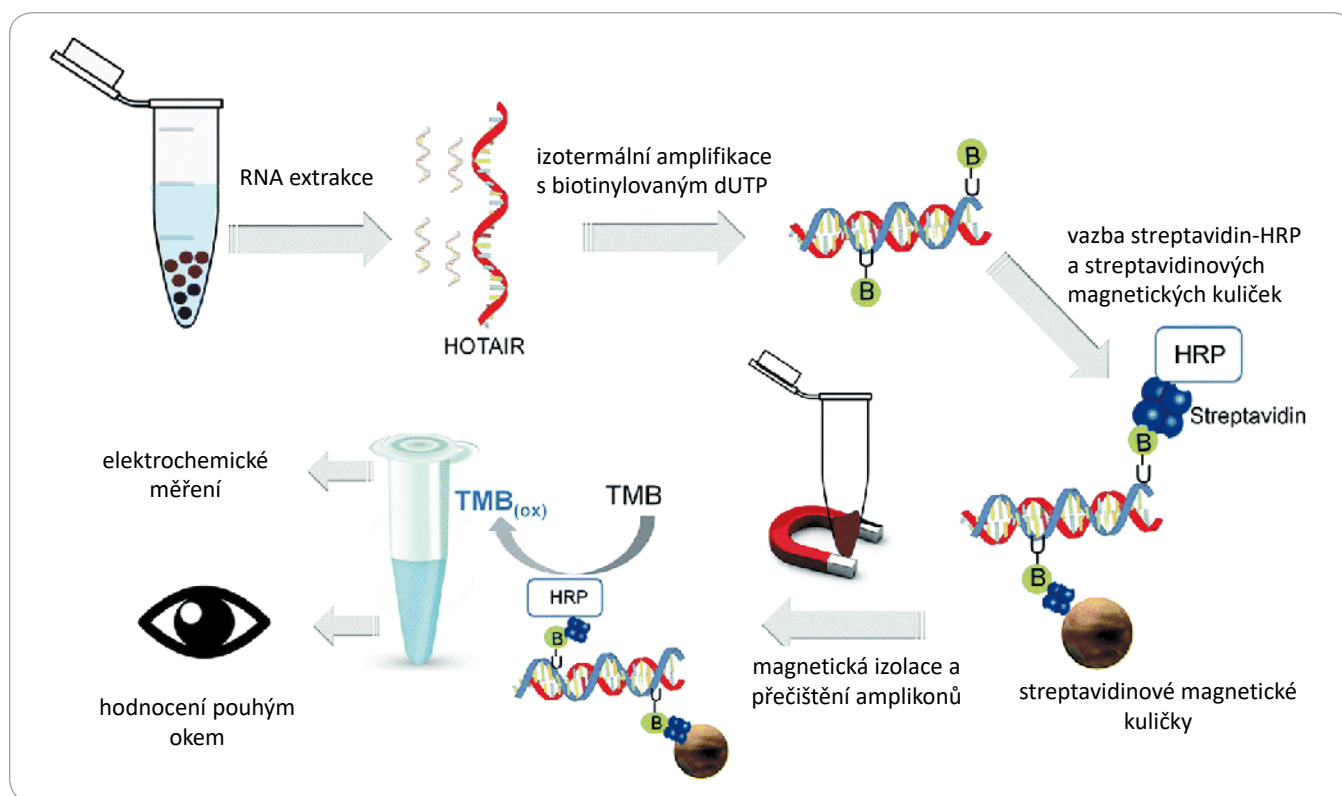
niscenčně značené DNA sondy komplementární k RNA. Kvantifikace se provádí měřením intenzity produkovaného záření a jejím porovnáním s referenčními vzorky, které jsou součástí diagnostické sady. Daný produkt je nabízen v lehce obměněné verzi specificky i pro PSA. Obě laboratorní stanovení se tedy dají provádět současně, a je tak možné PCA3 hodnoty vztáhnout k hladině PSA [42].

PCA3 je možné detekovat také pomocí klasické imunoenzymatické metody (enzyme-linked immuno sorbent assay – ELISA). Tuto možnost komerčně nabízí společnost MyBioSource pod názvem PCA3 ELISA Kit. Ten je ovšem určen pouze pro výzkumné účely a nemá oprávnění pro použití v klinické diagnostice. Princip metody vychází z klasické sendvičové ELISA. PCA3 je zachycena pomocí PCA3-specifické protilátky a poté označena další specifickou protilátkou konjugovanou s křenuvou peroxidázou. Na základě enzymatické reakce peroxidázy se substrátem vzniká barevný produkt, který je kvantifikován měřením absorbance při 450 nm [43].

I ostatní vyvíjené metody jsou určeny pouze pro výzkumné účely, obvykle se jedná o modifikaci metod pro detekci dlouhých RNA obecně, i když ne všechny jsou použitelné. Některé z nich určeny pro izolaci, identifikaci nebo nespecifickou amplifikaci mRNA např. využívají přítomnosti poly(A) konce na 3'-konci mRNA. Vzhledem k tomu, že ne všechny

lncRNA nesou poly(A) konec [44], může tak při vysokokapacitních analýzách docházet k zatížení velkými chybami. Technologie sekvenování nové generace přitom často využívá záchyt mRNA pomocí poly(T) oligonukleotidů. Společnost Novogene [45] tak nabízí protokol a reagentie k vytváření knihoven a sekvenací profilů lncRNA a firma Roche pod označením SeqCap lncRNA probes [46] nabízí doplňkové sondy lncRNA pro kompletní profilaci celého transkriptomu. Oproti tomu společnost Illumina v rámci standardního protokolu využívá metodu přípravy sekvenční knihovny z depletované RNA (celkové RNA zbavené ribozomální RNA), a tudíž nedochází ke ztrátě informace o lncRNA bez poly(A) konců. Tento postup tedy umožňuje celkovou analýzu lncRNA profilu bez nutnosti pořízení dodatečných reagentů nebo obměny protokolu [47].

Další metodou z klasického portfolia pro studium mRNA je polymerázová řetězová reakce s reverzní transkripcí. Touto metodou nejprve dochází k přepisu RNA do cDNA a ta je následně amplifikována. V reálném čase je zaznamenáván nárůst fluorescence, který koresponduje s množstvím DNA ve vzorku. Některé společnosti vyvinuly reagentie pro přepis do cDNA pomocí univerzálních poly(T) primerů, které se vážou na poly(A) konce. Tento přístup je pro komplexní analýzu lncRNA nevhodný, dá se ovšem modifikovat jed-



Obr. 2. Schéma kolorimetrické a elektrochemické detekce HOTAIR kombinující izotermální amplifikace lncRNA, vazbu amplikonů na magnetické kuličky a enzymatickou reakci zprostředkovanou HRP. TMB jakožto substrát pro HRP je detekován volným okem nebo citlivěji elektrochemicky. Upraveno z [58], se svolením Royal Society of Chemistry.

HRP – křenuv peroxidáza, TMB – tetrametylbendizin

noduchou kombinací poly(T) primerů a tzv. random hexamers (využívaných v nespecifické reverzní transkripci). Tuto vylepšenou a zjednodušenou variantu pro studium lncRNA nabízí např. společnost BioRad [48].

Klasickou metodou pro kvantifikaci lncRNA *in situ* je i fluorescenční *in situ* hybridizace (FISH), která využívá fluorescenční hybridizační sondu komplementární ke studované lncRNA a umožňuje kvantifikaci a lokalizaci pomocí fluorescenčního mikroskopu. Firma LGC Biosearch Technologies nabízí sadu reagentů pod názvem Stelaris® RNA FISH a fluorescenčně značené sondy pro nejčastěji studované lncRNA vč. možnosti značení různými fluorofory pro simultánní detekci více biomolekul současně [49].

Další možnost kvantifikace lncRNA představuje elektrochemie, která nabízí relativně levné a nenáročné přístrojové vybavení, možnost miniaturizace a paralelního měření. Zajímavým příkladem

je elektrochemický biosenzor založený na izotermální amplifikaci s dUTP značeným biotinem [50]. Amplikony byly přes vazbu streptavidin-biotin navázány na streptavidinové magnetické kuličky a zároveň označeny peroxidázou konjugovanou s biotinem (obr. 2). Výsledný komplex byl inkubován s tetrametylbendizinem, jehož oxidovaný produkt vykazuje modré zbarvení pozorovatelné pouhým okem. Autoři kvantifikovali HOTAIR lncRNA spektrofotometricky při 652 nm a paralelně i elektrochemicky pomocí chronoamperometrie. Metoda byla vyvinuta na ovariálních nádorových liniích a validována na vzorcích plazmy od tří pacientek s epiteliálním ovariálním karcinomem a dvou benigních kontrol. Ještě novější je biosenzor pro detekci lncRNA MALAT1 pomocí zlatých nanočástic, polyamid-aminu, detekční sondy a peroxidázy [51]. Autoři zde demonstrovali použití biosenzoru na jaterních nádorových liniích, avšak použili vzorky krevní plazmy pouze pro hledání

případných interferencí s detekční metodou přidávkem syntetické molekuly MALAT1 do vzorků plazmy.

Závěr

Přítomnost, a tudíž snadná detekovatelnost lncRNA nejen v tkáních, ale především v tělních tekutinách nabízí možnost širokého využití lncRNA jako prognostického a prediktivního biomarkeru. Velké množství lncRNA skýtá obrovský potenciál k diagnostickému využití, avšak dobře prostudovaných mechanismů působení a funkcí lncRNA je doposud objasněno jen několik set. Díky tkáňové specificitě hladin lncRNA lze vybrat vhodné kandidáty pro včasný záchyt onkologických onemocnění i pro doplnění panelu již existujících biomarkerů za účelem zpřesnění diagnostiky. V posledních letech se provádějí zejména meta-analýzy kombinující výsledky jednotlivých studií, hledající na základě chování nádoru vhodný biomarker predikující jeho vlastnosti. I přes důležitost

lncRNA bude pro jejich zařazení mezi klinicky relevantní biomarkery důležité vyvinout spolehlivé metody jejich detekce a prokázat, že hladiny studovaných lncRNA skutečně korelují s karcinogenezí, prognózou nebo rekurencí nádorového onemocnění.

Literatura

- Weidle UH, Birzele F, Kollmorgen G et al. Long non-coding RNAs and their role in metastasis. *Cancer Genom Proteom* 2017; 14(3): 143–160. doi: 10.21873/cgp.20027.
- Mattick JS, Rinn JL. Discovery and annotation of long noncoding RNAs. *Nat Struct Mol Biol* 2015; 22(1): 5–7. doi: 10.1038/nsmb.2942.
- noncode.org. An integrated knowledge database dedicated to ncRNAs, especially lncRNAs. [online]. Available from: <http://www.noncode.org/>.
- LNCipedia. A comprehensive compendium of human long non-coding RNAs. [online]. Available from: <https://lncipedia.org/>.
- Volders PJ, Anckaert J, Verheggen K et al. LNCipedia 5: towards a reference set of human long non-coding RNAs. *Nucleic Acid Res* 2018; 47(D1): D135–D139. doi: 10.1093/nar/gky1031.
- Gibbons HR, Shaginurova G, Kim LC et al. Divergent lncRNA GATA3-AS1 regulates GATA3 transcription in T-helper 2 cells. *Front Immunol* 2018; 9: 2512. doi: 10.3389/fimmu.2018.02512.
- Šána J, Faltejsková P, Svoboda M et al. Dlouhé nekódující RNA a jejich význam u nádorových onemocnění. *Klin Onkol* 2012; 25(4): 246–254. doi: 10.14735/amko2012246.
- Dykes IM, Emanuelli C. Transcriptional and post-transcriptional gene regulation by long non-coding RNA. *Genom Proteom Bioinform* 2017; 15(3): 177–186. doi: 10.1016/j.gpb.2016.12.005.
- Gromesová B, Kubáčková V, Bollová B et al. Potenciál dlouhých nekódujících molekul RNA v diagnostice nádorových onemocnění. *Klin Onkol* 2016; 29(1): 20–28. doi: 10.14735/amko201620.
- Qi P, Zhou XY, Du X. Circulating long non-coding RNAs in cancer: current status and future perspectives. *Mol Cancer* 2016; 15(1): 39. doi: 10.1186/s12943-016-0524-4.
- Schmitt AM, Chang HY. Long noncoding RNAs in cancer pathways. *Cancer Cell* 2016; 29(4): 452–463. doi: 10.1016/j.ccr.2016.03.010.
- Sallam T, Sandhu J, Tontozon P. Long noncoding RNA discovery in cardiovascular disease. *Circul Res* 2018; 122(1): 155–166. doi: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311802.
- Luo Q, Chen Y. Long noncoding RNAs and Alzheimer's disease. *Clin Interv Aging* 2016; 11: 867–872. doi: 10.2147/CIAS.107037.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 100(1): 57–70. doi: 10.1016/S0092-8674(00)81683-9.
- Hanahan D, Weinberg Robert A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011; 144(5): 646–674. doi: 10.1016/j.cell.2011.02.013.
- de Oliveira JC, Oliveira LC, Mathias C et al. Long non-coding RNAs in cancer: Another layer of complexity. *J Gene Med* 2019; 21(1): e3065. doi: 10.1002/jgm.3065.
- Bhan A, Mandal SS. lncRNA HOTAIR: a master regulator of chromatin dynamics and cancer. *Biochim Biophys Acta* 2015; 1856(1): 151–164. doi: 10.1016/j.bbcan.2015.07.001.
- Gupta RA, Shah N, Wang KC et al. Long non-coding RNA HOTAIR reprograms chromatin state to promote cancer metastasis. *Nature* 2010; 464(7291): 1071–1076. doi: 10.1038/nature08975.
- Avazpour N, Hajjari M, Tahmasebi Birgani M. HOTAIR: a promising long non-coding RNA with potential role in breast invasive carcinoma. *Front Genet* 2017; 8: 170. doi: 10.3389/fgenet.2017.00170.
- Luo ZF, Zhao D, Li XQ et al. Clinical significance of HOTAIR expression in colon cancer. *World J Gastroenterol* 2016; 22(22): 5254–5259. doi: 10.3748/wjg.v22.i22.5254.
- Yang SZ, Xu F, Zhou T et al. The long non-coding RNA HOTAIR enhances pancreatic cancer resistance to TNF-related apoptosis-inducing ligand. *J Biol Chem* 2017; 292(25): 10390–10397. doi: 10.1074/jbc.M117.786830.
- Liu S, Lei H, Luo F et al. The effect of lncRNA HOTAIR on chemoresistance of ovarian cancer through regulation of HOXA7. *Biol Chem* 2018; 399(5): 485–497. doi: 10.1515/hsz-2017-0274.
- Zhang A, Zhao JC, Kim J et al. lncRNA HOTAIR enhances the androgen-receptor-mediated transcriptional program and drives castration-resistant prostate cancer. *Cell Rep* 2015; 13(1): 209–221. doi: 10.1016/j.celrep.2015.08.069.
- Xiao Z, Qu Z, Chen Z et al. lncRNA HOTAIR is a prognostic biomarker for the proliferation and chemoresistance of colorectal cancer via miR-203a-3p-mediated wnt/ β -catenin signaling pathway. *Cell Physiol Biochem* 2018; 46(3): 1275–1285. doi: 10.1159/000489110.
- Wright CM. Long noncoding RNAs and cancer. In: Gray SG (ed). *Epigenetic Cancer Therapy*. Boston: Academic Press 2015: 91–114.
- Lu Y, Madu C. Prostate cancer biomarkers. In: Gupta RC (ed). *Biomarkers in Toxicology*. Boston: Academic Press 2014: 771–783.
- de Kok JB, Verhaegh GW, Roelofs RW et al. DD3 (PCA3), a very sensitive and specific marker to detect prostate tumors. *Cancer Res* 2002; 62(9): 2695–2698.
- Bussemakers MJG, van Bokhoven A, Verhaegh GW et al. DD3: a new prostate-specific gene, highly overexpressed in prostate cancer. *Cancer Res* 1999; 59(23): 5975–5979.
- Taille Adl, Irani J, Graefen M et al. Clinical evaluation of the PCA3 assay in guiding initial biopsy decisions. *J Urol* 2011; 185(6): 2119–2125. doi: 10.1016/j.juro.2011.01.075.
- Gutschner T, Hämmerle M, Eissmann M et al. The non-coding RNA MALAT1 is a critical regulator of the metastasis phenotype of lung cancer cells. *Cancer Res* 2013; 73(3): 1180–1189. doi: 10.1158/0008-5472.CAN-12-2850.
- Wang X, Li M, Wang Z et al. Silencing of long noncoding RNA MALAT1 by miR-101 and miR-217 inhibits proliferation, migration, and invasion of esophageal squamous cell carcinoma cells. *J Biol Chem* 2015; 290(7): 3925–3935. doi: 10.1074/jbc.M114.596866.
- Tripathi V, Shen Z, Chakraborty A et al. Long non-coding RNA MALAT1 controls cell cycle progression by regulating the expression of oncogenic transcription factor B-MYB. *PLoS Genet* 2013; 9(3): e1003368. doi: 10.1371/journal.pgen.1003368.
- Ying L, Chen Q, Wang Y et al. Upregulated MALAT-1 contributes to bladder cancer cell migration by inducing epithelial-to-mesenchymal transition. *Mol Biosyst* 2012; 8(9): 2289–2294. doi: 10.1039/c2mb25070e.
- Wu XS, Wang XA, Wu WG et al. MALAT1 promotes the proliferation and metastasis of gallbladder cancer cells by activating the ERK/MAPK pathway. *Cancer Biol Ther* 2014; 15(6): 806–814. doi: 10.4161/cbt.28584.
- Hu L, Wu Y, Tan D et al. Up-regulation of long noncoding RNA MALAT1 contributes to proliferation and metastasis in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Oncol* 2015; 34(1): 7. doi: 10.1186/s13046-015-0123-z.
- Ma KX, Wang HJ, Li XR et al. Long noncoding RNA MALAT1 associates with the malignant status and poor prognosis in glioma. *Tumour Biol* 2015; 36(5): 3355–3359. doi: 10.1007/s13277-014-2969-7.
- Tian X, Xu G. Clinical value of lncRNA MALAT1 as a prognostic marker in human cancer: systematic review and meta-analysis. *BMJ Open* 2015; 5(9): e008653. doi: 10.1136/bmjopen-2015-008653.
- Kim J, Piao HL, Kim BJ et al. Long noncoding RNA MALAT1 suppresses breast cancer metastasis. *Nat Genet* 2018; 50(12): 1705–1715. doi: 10.1038/s41588-018-0252-3.
- Oliva-Rico D, Herrera LA. Regulated expression of the lncRNA TERRA and its impact on telomere biology. *Mech Age Develop* 2017; 167: 16–23. doi: 10.1016/j.mad.2017.09.001.
- Sampl S, Pramhas S, Stern C et al. Expression of telomeres in astrocytoma WHO grade 2 to 4: TERRA level correlates with telomere length, telomerase activity, and advanced clinical grade. *Transl Oncol* 2012; 5(1): 56–65. doi: 10.1593/tlo.11202.
- Cusanelli E, Chartrand P. Telomeric repeat-containing RNA TERRA: a noncoding RNA connecting telomere biology to genome integrity. *Front Genet* 2015; 6: 143. doi: 10.3389/fgenet.2015.00143.
- Durand X, Moutereau S, Xylinas E et al. Progenitor PCA3 test for prostate cancer. *Exp Rev Mol Diagn* 2011; 11(2): 137–144. doi: 10.1586/erm.10.122.
- MyBioSource.com. PCA3 elisa kit: human prostate cancer antigen 3 (PCA3) ELISA kit. [online]. Available from: <https://www.mybiosource.com/pca3-human-elisa-kits/prostate-cancer-antigen-3-pca3/109022>.
- Yang Q, Wan Q, Zhang L et al. Analysis of lncRNA expression in cell differentiation. *RNA Biol* 2018; 15(3): 413–422. doi: 10.1080/15476286.2018.1441665.
- Novogene.com. lncRNA SEQUENCING. [online]. Available from: <https://en.novogene.com/next-generation-sequencing-services/gene-regulation/lncrna-sequencing/>.
- sequencing.roche.com. SeqCap lncRNA Probes. [online]. Available from: <https://sequencing.roche.com/en/products-solutions/by-category/target-enrichment/hybridization/seqcap-lncrna.html>.
- illumina.com. rRNA & Globin mRNA removal kit selection guide. [online]. Available from: <https://www.illumina.com/products/selection-tools/rrna-depletion-selection-guide.html>.
- bio-rad.com. lncRNA RT-qPCR workflow. [online]. Available from: <http://www.bio-rad.com/en-cz/category/lncrna-rt-qpcr-workflow?ID=OUJ92R15>.
- Coassin SR, Orjalo AV, Semaan SJ et al. Simultaneous detection of nuclear and cytoplasmic RNA variants utilizing Stellaris[®] RNA fluorescence in situ hybridization in adherent cells. In: Nielsen BS (ed). *In Situ Hybridization Protocols*. New York: Springer 2014: 189–199.
- Islam MN, Moriam S, Umer M et al. Naked-eye and electrochemical detection of isothermally amplified HOTAIR long non-coding RNA. *Analyst* 2018; 143(13): 3021–3028. doi: 10.1039/c7an02109g.
- Liu F, Li T, Zhang L et al. PAMAM/polyhedral nanogold-modified probes with DNAase catalysis for the amperometric electrochemical detection of metastasis-associated lung adenocarcinoma transcript 1. *J Biol Eng* 2019; 13(1): 21. doi: 10.1186/s13036-019-0149-4.
- Kim T, Cui R, Jeon YJ et al. Long-range interaction and correlation between MYC enhancer and oncogenic long noncoding RNA CARLO-5. *Proc Natl Acad Sci USA* 2014; 111(11): 4173–4178. doi: 10.1073/pnas.1400350111.
- Léveillé N, Melo CA, Rooijers K et al. Genome-wide profiling of p53-regulated enhancer RNAs uncovers a subset of enhancers controlled by a lncRNA. *Nat Commun* 2015; 6: 6520. doi: 10.1038/ncomms7520.
- Lian Y, Yan C, Xu H et al. A novel lncRNA, LINC00460, affects cell proliferation and apoptosis by regulating KLF2 and CUL4A expression in colorectal cancer. *Mol Ther Nucl Acid* 2018; 12: 684–697. doi: 10.1016/j.jomtn.2018.06.012.
- Zhao J, Du P, Cui P et al. lncRNA PVT1 promotes angiogenesis via activating the STAT3/VEGFA axis in gastric cancer. *Oncogene* 2018; 37(30): 4094–4109. doi: 10.1038/s41388-018-0250-z.
- Munschauer M, Nguyen CT, Sirokman K et al. The NORAD lncRNA assembles a topoisomerase complex critical for genome stability. *Nature* 2018; 561(7721): 132–136. doi: 10.1038/s41586-018-0453-z.

57. Huang D, Chen J, Yang L et al. NKILA lncRNA promotes tumor immune evasion by sensitizing T cells to activation-induced cell death. *Nat Immunol* 2018; 19(10): 1112–1125. doi: 10.1038/s41590-018-0207-y.
58. Zhang X, Rice K, Wang Y et al. Maternally expressed gene 3 (MEG3) noncoding ribonucleic acid: isoform structure, expression, and functions. *Endocrinology* 2010; 151(3): 939–947. doi: 10.1210/en.2009-0657.
59. Svoboda M, Slysokva J, Schneiderova M et al. HOTAIR long non-coding RNA is a negative prognostic factor not only in primary tumors, but also in the blood of colorectal cancer patients. *Carcinogenesis* 2014; 35(7): 1510–1515. doi: 10.1093/carcin/bgu055.
60. Li X, Wu Z, Mei Q et al. Long non-coding RNA HOTAIR, a driver of malignancy, predicts negative prognosis and exhibits oncogenic activity in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer* 2013; 109(8): 2266–2278. doi: 10.1038/bjc.2013.548.
61. Okugawa Y, Toyama Y, Hur K et al. Metastasis-associated long non-coding RNA drives gastric cancer development and promotes peritoneal metastasis. *Carcinogenesis* 2014; 35(12): 2731–2739. doi: 10.1093/carcin/bgu200.
62. Guo W, Dong Z, Bai Y et al. Associations between polymorphisms of HOTAIR and risk of gastric cardia adenocarcinoma in a population of north China. *Tumor Biol* 2015; 36(4): 2845–2854. doi: 10.1007/s13277-014-2912-y.
63. Crawford ED, Rove KO, Trabulsi EJ et al. Diagnostic performance of PCA3 to detect prostate cancer in men with increased prostate specific antigen: a prospective study of 1,962 cases. *J Urol* 2012; 188(5): 1726–1731. doi: 10.1016/j.juro.2012.07.023.
64. Roobol MJ, Schröder FH, van Leeuwen P et al. Performance of the prostate cancer antigen 3 (PCA3) gene and prostate-specific antigen in prescreened men: exploring the value of PCA3 for a first-line diagnostic test. *Eur Urol* 2010; 58(4): 475–481. doi: 10.1016/j.eururo.2010.06.039.
65. Ochiai A, Okihara K, Kamoi K et al. Clinical utility of the prostate cancer gene 3 (PCA3) urine assay in Japanese men undergoing prostate biopsy. *BJU Int* 2013; 111(6): 928–933. doi: 10.1111/j.1464-410X.2012.11683.x.
66. Ji P, Diederichs S, Wang W et al. MALAT-1, a novel non-coding RNA, and thymosin β 4 predict metastasis and survival in early-stage non-small cell lung cancer. *Oncogene* 2003; 22(39): 8031–8041. doi: 10.1038/sj.onc.1206928.
67. Wang Z, Katsaros D, Biglia N et al. High expression of long non-coding RNA MALAT1 in breast cancer is associated with poor relapse-free survival. *Breast Cancer Res Treat* 2018; 171(2): 261–271. doi: 10.1007/s10549-018-4839-2.