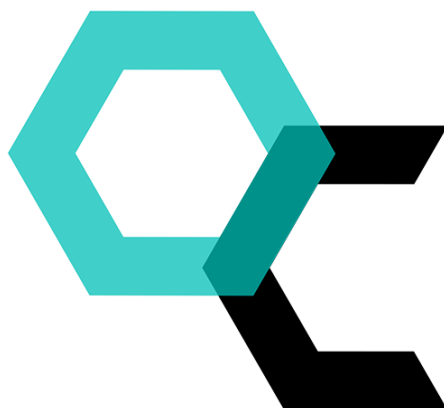


UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
Katedra organické chemie



LongRNAs jako prognostické biomarkery u meningiomů

Diplomová práce

Autor:	Bc. Tereza Virglová
Studijní program:	N1407 Chemie
Studijní obor:	Bioorganická chemie a chemická biologie
Typ studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	Mgr. Hanuš Slavík

Olomouc 2020

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem předloženou diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením Mgr. Hanuše Slavíka a že jsem uvedla všechny informační zdroje, které uvádím v seznamu použité literatury.

Souhlasím s tím, aby má práce byla zpřístupněna v knihovně Katedry organické chemie, Přírodovědecké fakulty, Univerzity Palackého v Olomouci.

V Olomouci, dne

.....

Tereza Virglová

Poděkování:

V první řadě bych ráda poděkovala svému vedoucímu, Mgr. Hanuši Slavíkovi, za možnost práce na tomto tématu, za jeho připomínky, rady a pomoc nejen při práci v laboratoři, ale také při zpracovávání diplomové práce. Děkuji Mgr. Barboře Blumové za pomoc při tvorbě histologických preparátů na mikrotomu. Ráda bych poděkovala RNDr. Karlu Kobernovi, CSc. za pomoc při obrazové analýze a focení vzorků a za jeho cenné informace k fluorescenčnímu mikroskopu. Ing. Mgr. Ivo Überallovi, Ph.D. děkuji za pomoc při obrazové analýze. Ráda bych také poděkovala Mgr. Pavle Kouřilové, Ph.D. za její trpělivost a informace při statistickém zpracování dat. V neposlední řadě bych ráda poděkovala své rodině za podporu během studia i při psaní závěrečné práce. Tato práce byla podpořena vnitřními granty Univerzity Palackého v Olomouci IGA_LF_2019_003 a IGA_LF_2020_007 a Evropským fondem pro regionální rozvoj – Projekt ENOCH (No.CZ.02.1.01/0.0/0.0/16_019/0000868).

Bibliografická identifikace:

Jméno a příjmení autora:	Bc. Tereza Virglová
Název práce:	LongRNAs jako prognostické biomarkery u meningiomů
Typ práce:	Diplomová
Pracoviště:	Laboratoř experimentální medicíny, Ústav molekulární a translační medicíny, Lékařská fakulta Univerzity Palackého v Olomouci a Fakultní nemocnice Olomouc
Vedoucí práce:	Mgr. Hanuš Slavík
Rok obhajoby práce:	2020
Abstrakt:	<p>MEG3 je imprintovaný gen, nacházející se na chromozomu 14, který kóduje přibližně 1,6 kb lncRNA. LncRNA jsou stabilní v tělních tekutinách a zapojeny do mnoha buněčných procesů. Mají důležitou roli ve vývoji různých nádorových onemocnění, například meningiomů – nádorů pocházejících z mozkových plen. Meningiomy jsou známé svou rekurencí, dokonce i benigních forem, v průběhu 5 až 10 let. Gen MEG3 je možné detekovat pomocí RNA in situ hybridizace (RISH). Metoda RISH se jeví jako vhodná metoda pro analýzu lokalizace a míry exprese MEG3. V diplomové práci byly zjištěny signifikantní rozdíly ve tvorbě klastrů transkriptu MEG3 při porovnání rekurentních a nerekurentních pacientů, avšak metoda zatím není vhodná pro použití v klinické praxi jako predikce prognózy. Bylo potvrzeno, že s vyšším WHO gradem stoupá riziko rekurence, avšak nebyla nalezena žádná spojitost mezi MEG3 a WHO gradem z hlediska míry exprese a lokalizace.</p>
Klíčová slova:	MEG3, meningiomy, lncRNAs
Počet stran:	86
Jazyk:	Český

Bibliographical identification:

Author's first name and surname: Bc. Tereza Virglová

Title: LongRNAs as prognostic biomarkers in meningiomas

Type of thesis: Master thesis

Department: Laboratory of Experimental Medicine, Institute of Molecular and Translational Medicine, Faculty of Medicine and Dentistry, Palacky University and University Hospital Olomouc

Advisor: Mgr. Hanuš Slavík

The year of presentation: 2020

Abstract: MEG3 is a imprinted gene, localized on chromosome 14, that encodes the lncRNA containing approximately 1.6 kbs. LncRNA are stable in body fluids and they are involved in many cellular processes. They play an important role in the development of various cancers, for example meningiomas - tumors arising from meninges. Meningiomas can recur even from their benign forms during the time period from 5 to 10 years. The aim of this work was detection and analysis of MEG3 transcripts by RNA in situ hybridisation (RISH) and investigation of the localization and expression of MEG3. Significant differences between recurrent and non-recurrent patients have been found in creation of clusters of MEG3 transcripts. However, the method is still not suitable for the utility in clinical prognostication of meningioma recurrence. Additionally, it was confirmed that the risk of recurrence increases with higher WHO grade, but there is no relationship between WHO grade and the MEG3 expression and localization.

Keywords: MEG3, meningiomas, lncRNAs

Number of pages: 86

Language: Czech

Obsah

1	Úvod.....	11
2	Cíle práce.....	12
3	Teoretická část.....	13
3.1	Meningiomy	13
3.1.1	Diagnostika.....	14
3.1.2	Léčba	18
3.1.3	Identifikace a charakterizace genetických a molekulárních změn	19
3.2	Dlouhé nekódující ribonukleové kyseliny (lncRNA).....	22
3.2.1	Klasifikace lncRNA.....	23
3.2.2	Funkce lncRNA.....	25
3.2.3	Biologická role lncRNA: asociace s nemocemi	29
3.2.4	LncRNA jako biomarkery	31
3.3	MEG3 (Maternally expressed gene 3).....	32
3.3.1	MEG3 a metylace	33
3.3.2	MEG3 a p53	34
3.3.3	MEG3 a Rb.....	35
3.3.4	MEG3 a izoformy.....	35
3.3.5	MEG3 a cAMP.....	36
3.3.6	MEG3 a angiogeneze	36
4	Experimentální část	38
4.1	Biologický materiál	38
4.2	Použité přístroje a chemikálie	39
4.3	Použité experimentální postupy	39
4.3.1	Krájení preparátů na mikrotomu	39
4.3.2	Navázání sondy a barvení preparátů.....	40
4.3.3	Použití fluorescenčního a konfokálního mikroskopu	44
4.3.4	Obrazová analýza	45
4.3.5	Použité statistické metody	45
4.4	Popis pacientů.....	45
5	Výsledky.....	47
5.1	Optimalizace přípravy preparátů	47
5.2	Statistické hodnocení.....	54
6	Diskuze.....	65
7	Závěr.....	68
8	Literatura	69

Seznam použitých zkratk:

RNA	ribonukleová kyselina
DNA	deoxyribonukleová kyselina
mRNA	mediátorová RNA
lncRNA	dlouhá nekódující RNA
MEG3	mateřsky exprimovaný gen 3
WHO	světová zdravotnická organizace
RISH	RNA in situ hybridizace
MRI	magnetická rezonance
CT	počítačová tomografie
SPECT	jednofotonová emisní výpočetní tomografie
PET	pozitronová emisní tomografie
SSR	somatostatinové receptory
EMA	epiteliální membránový antigen
HE	hematoxylin-eosin
HPF	vysoce výkonná pole
NF2	gen neurofibromatózy 2
BAM22	podjednotka komplexu AP1 β 1
BCR	breakpoint cluster region protein
TIMP	inhibitor metalopeptidázy
MMP	matrix metalopeptidázy
ALPL	gen alkalin fosfatázy
NDRG2	N-myc downstream-regulated gene
AKT1	gen AKT serine/threonin kináza

CDKN2	cyklin dependentní kináza 2
TIMP3	inhibitor metalopeptidázy 3
MDM2	mouse double minute 2 homolog, E3 ligáza
p14ARF	nádorový supresor alternativního čtecího rámce produktu CDKN2
WNK2	serin/threonin protein kináza
MEK1	mitogem aktivovaná protein kináza 1
EGFR	receptor epidermálního růstového faktoru
miRNA	mikroRNA
tRNA	transferová RNA
rRNA	ribosomální RNA
NATs	přirozené antisense transkripty
PCG	protein kódující geny
KCNQ1ot1	kcnq1 překrývající se transkript 1
Air	Air nekódující RNA
Gas 5	specifické zastavení růstu 5
PANDA	P21-associated ncRNA DNA damage-activated
NF-YA	jaderný transkripční faktor Y podjednotka α
TERC	telomerázová RNA složka
RNP	ribonukleoprotein
H19	imprintovaný mateřsky exprimovaný transkript
Xist	X-inaktivní specifický transkript
Xic	X-inaktivní centrum
BWS	Becwith-Wideremannův syndrom
IGF2	růstový faktor podobný inzulínu 2

HOTAIR	HOX transkripční antisense RNA
HOX	homeobox gen
BRCA1	protein citlivosti na rakovinu prsu typu 1
TERRA	telomerní repetice obsahující RNA
TRF1, TRF2	faktor opakování telomer 1 a 2
ORG	komplex rozpoznávání původu
GTL2/MEG3	mateřsky exprimovaný gen
DLK1	otcovsky exprimovaný gen
TATA box	klíčová část promotoru
poly(A) sekvence	sekvence opakujících se adeninových bází malé jaderné ribonukleotidové částice
ICR	imprintované kontrolní regiony
p53	nádorový protein p53
Rb	retinoblastomový protein
CpG	dinukleotid cytosin-fosfát-guanin
TP53	nádorový supresorový gen
GDF15	růstový diferenciační faktor 15
TGF β	transformující růstový faktor β
HCT116	lidská buněčná linie rakoviny tlustého střeva
AML	akutní myeloidní leukémie
M1, M2, M3	muskarinové acetylcholinové receptory 1, 2 a 3
D-Cdk4	cyklin D a cyklin-dependentní kináza 4
Cdk6	cyklin-dependentní kináza 6
E-Cdk2	cyklin E a cyklin-dependentní kináza 2
E2F	skupina genů, kódujících rodinu transkripčních faktorů

p16	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2A
p15	inhibitor cyklin-dependentní kinázy 2B
DNMT3A	DNA (cytosin-5)-metyltransferáza 3A
cAMP	cyklický adenosinmonofosfát
CRE	cAMP reaktivní element
CREB	cAMP protein vázající prvek
VEGFA	vaskulární endoteliální růstový faktor A
VEGFR1	receptor vaskulárního endoteliálního růstového faktoru 1
PBS	fosfátový pufr
RT	pokožová teplota
AP	alkalická fosfatáza
RT-qPCR	reverse transcription quantitative polymerase chain reaction

1 Úvod

RNA mají v organismu různé funkce a dělí se na kódující a nekódující RNA. Mezi kódující se řadí mRNA a všechny ostatní patří do skupiny nekódujících. Dlouhé nekódující RNA (lncRNA) jsou více než 200 nukleotidů dlouhé a nedochází u nich k překlada do proteinu¹. V posledních letech si lncRNA získaly pozornost jako biologické regulátory podílející se na patogenezi mnoha onemocnění. LncRNA jsou různě exprimovány u rozličných typů nádorů a mohou tedy fungovat i jako biomarkery těchto onemocnění¹.

MEG3 je imprintovaný gen, který je složený z deseti exonů². Kóduje přibližně 1,6 kb dlouhou nekódující RNA. Nachází se na chromozomu 14 a jeho myší homolog na chromozomu 12³. MEG3 je v lidském organismu exprimována v mozku a na dalších místech. Ztráta exprese MEG3 vede k nádorovým onemocněním a tvorbě nádorových buněčných linií. Naopak re-exprese potlačuje růst nádoru a podporuje buněčnou apoptózu. MEG3 by se díky tomu mohl stát ideálním kandidátem jako biomarker v podobě nádorového supresoru u meningiomů⁴.

Meningiomy jsou nádory mozku, které pravděpodobně vznikají z pavučnice. Většina případů je řešena chirurgickým zákrokem, pokud nelze zákrok provést, používá se radioterapie. Nádory se více objevují u žen a vyskytují se ve třech stupních – WHO gradech. Čím je WHO grade vyšší, tím je diferenciací nádorové tkáně nižší, což vede u pacientů k horší prognóze. Velkým problémem u meningiomů je jejich rekurence i u častých benigních forem^{5,6}. U meningiomů dochází ke genetickým změnám na chromozomu 22, 1, 14 a dalších. Z hlediska prognózy byl chromozom 14 identifikován jako prognostický indikátor recidivy nádoru, hlavně u vyšších stupňů meningiomů. Zvláště pak oblast 14q je relevantní pro progresi meningiomů. V této oblasti pak Zhang⁷ a jeho kolegové identifikovali gen MEG3, který je vhodným kandidátem pro detailnější výzkum⁸.

Cílem diplomové práce bylo detekovat transkript genu MEG3 v tkáňových řezech meningiomů. Chirurgicky odstraněné meningiomy byly získány z Fakultní nemocnice v Olomouci. Transkripty genu MEG3 byl v řezech identifikován pomocí RNA in situ hybridizace (RISH) a následně focen fluorescenčním mikroskopem. Pomocí obrazové analýzy byly vyhodnoceny jednotlivé signály genu MEG3 a statisticky korelovány s prognózou pacientů.

2 Cíle práce

1. Vypracování rešerše o lncRNA, genu MEG3 a jeho roli v meningiomech.
2. Vytvoření jednotlivých řezů z archivovaných chirurgicky odstraněných tkání pacientů s meningiomy.
3. Zachycení transkriptu genu MEG3 u tkáňových řezů pacientů pomocí RNA in situ hybridizace (RISH).
4. Analýza lokalizace a míry exprese MEG3 a následná korelace s prognózou pacientů.

3 Teoretická část

3.1 Meningiomy

Poprvé byl meningiom popsán Felixem Platerem roku 1614. První lékařská zpráva, která se zabývala meningiomy, byla zveřejněna roku 1774 chirurgem Antoinem Louistem. Nakonec byl pojem „meningiom“ poprvé použit v roce 1922 Harvey Cushingem^{9,10}. V publikaci popisoval nádory, které pocházejí z pavučnic – tenkých, průsvitných durálních krycích vaziv nacházejících se v mozku a míše. Od této doby došlo k velkému pokroku v léčbě, k lepší charakterizaci histologie a vývoji klasifikačních systémů, které poskytují přesnější prognostické informace⁶. U meningiomů je známo, že se vyskytují více u žen než u mužů, v poměru 2:1¹¹.

Světová zdravotnická organizace (WHO) vyvinula systém pro klasifikaci meningiomů. Klasifikace je zaměřena na zachycení jejich různorodého biologického a heterogenního klinického chování. Podle toho jsou meningiomy rozděleny do tří stupňů (gradů):

- benigní (stupeň I) se vyskytují ze všech meningiomů nejčastěji, asi z 80 %,
- atypický (stupeň II) se vyskytuje z 10-18 %,
- maligní (stupeň III) se vyskytuje nejméně, asi z 2-4 %¹².

U benigních forem dochází k časté progresi a vzniku atypických nebo maligních meningiomů¹³. Atypické a maligní meningiomy se vyskytují u pacientů s průměrným věkem asi 57 let, častěji u mužů⁵. WHO rozděluje jednotlivé stupně do patnácti subtypů. Devět subtypů spadá do benigních meningiomů, tři do atypických a tři do maligních¹¹. Třídění dle stupňů se zaměřuje na histomorfologii a mitotické indexy, které se často v jednotlivých stupních překrývají. Světová zdravotnická organizace uvádí, že u 25 % benigních meningiomů dochází u pacientů během života k rekurenci (opětovnému výskytu nádoru). Rekurence se objeví u 12-19 % benigních meningiomů během 5ti let. Meningiomy atypické rekurují s 29-52% pravděpodobností, u maligních je odhad rekurence 50-94 %¹². Roku 1998 činilo pětileté přežití 70 % u benigních meningiomů a 55 % u maligních. V roce 2018 byla u atypických a maligních meningiomů míra přežití do 5 let 65 % a 10 let 50 %⁵. Mezi známé rizikové faktory pro recidivu patří pohlaví (vyšší riziko recidivy u žen), rozsah resekce, monozomie chromozomu 14 a věk^{14,15}.

3.1.1 Diagnostika

Během minulého století byla klasifikace nádorů mozku založena převážně na histologii, klasifikaci podle mikroskopických podobností a úrovni diferenciaci. Nyní došlo, díky porozumění molekulárního a genetického základu, k velkým pokrokům¹⁶.

Klinické příznaky meningiomů se vztahují k jejich umístění. Často se vyskytují změny osobnosti, smyslové motorické nebo vizuální příznaky a záchvaty¹⁷. Při podezřeních na meningiom se používá magnetická rezonance (MRI) a počítačová tomografie (CT). CT byla brána za jakýsi standard při identifikaci meningiomů, avšak v současné době se více používá MRI vzhledem k rozlišení cévních struktur a vazeb k bázi lební¹⁸. Jednofotonová emisní výpočetní tomografie (SPECT) a pozitronová emisní tomografie (PET) poskytuje informace o buněčných procesech a biologických charakteristikách nádorů. PET se používá u pacientů, kde jsou nádory špatně detekovatelné nebo je třeba potvrdit MRI diagnostiku.

Studie za posledních dvacet let objasnily genetický základ tumorigeneze a přispěly k lepší klasifikaci nádorů centrální nervové soustavy (CNS). Některé genetické změny byly známy v CNS z WHO klasifikace z roku 2007 a poskytovaly prognostická nebo prediktivní data. Roku 2016 došlo k aktualizaci klasifikace a začlenily se molekulární parametry nádoru. Klasifikace WHO z roku 2016 obsahuje úzce definované diagnostické objekty zkoumání, které vedou k vyšší diagnostické přesnosti, lepší správě pacientů a celkově přesnějšímu stanovení prognózy a léčby¹⁶.

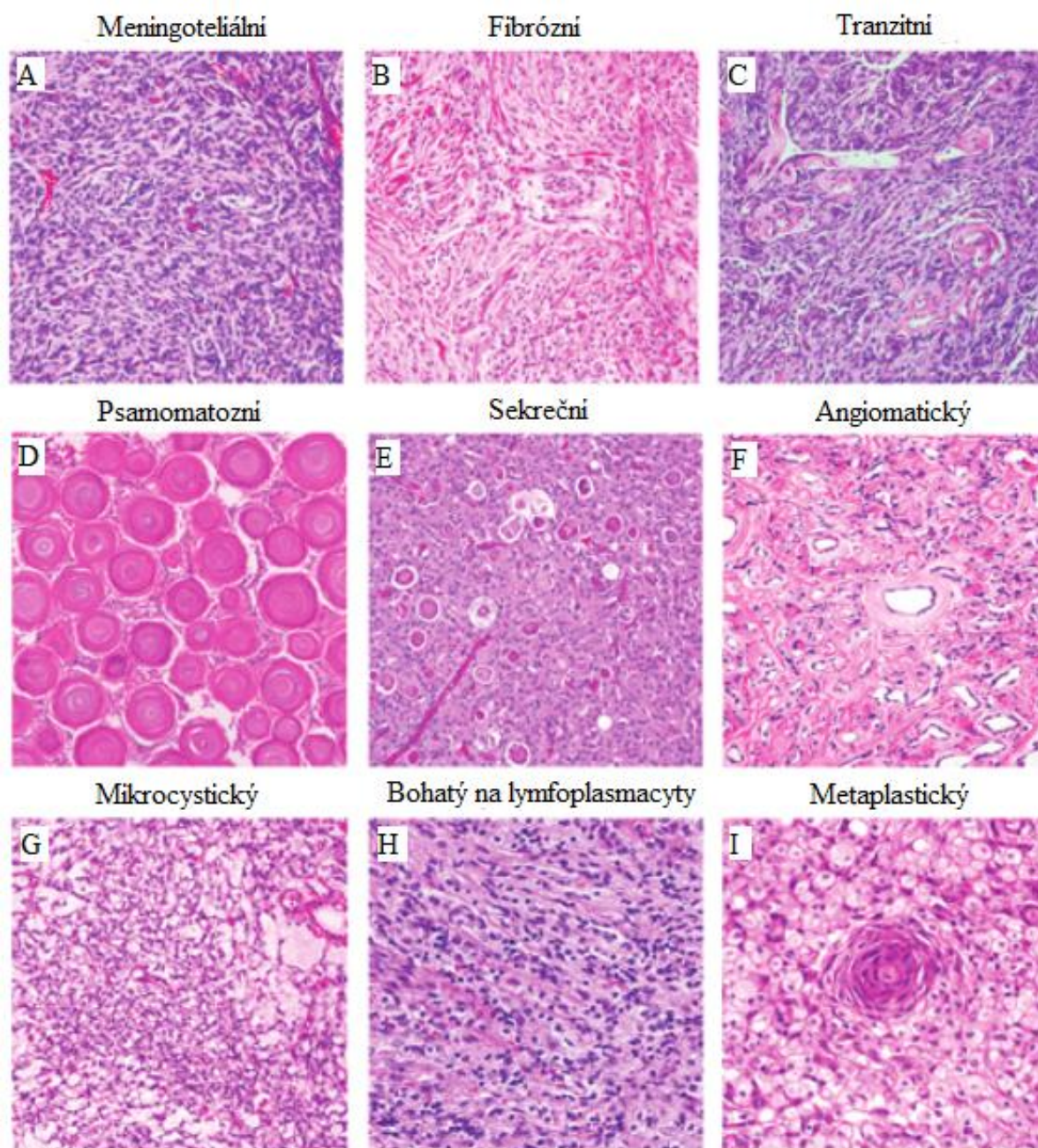
Většina meningiomů je pomocí barvení hematoxylinu-eosinu (HE) snadno diagnostikována. Meningiomy lze identifikovat i pomocí imunohistochemie¹⁹. Příkladem může být epiteliální membránový antigen (EMA), který se používá jako marker výskytu meningiomů, citlivost je 90 %²⁰. Dalším používaným biomarkerem je somatostatinový receptor (SSR) s citlivostí 95 %^{17,21,22}. Kombinací markerů EMA a SSR dochází k detekci všech meningiomů²². Mezi další kandidáty, detekovatelné v meningiomech, patří E-kadherin a konexiny, ale nejsou v klinických podmínkách běžné²³. Slibným potencionálním biomarkerem je prostaglandin D syntáza. Studie ukazují reaktivitu asi u 80 % meningiomů. Velkým problémem při detekci markerů bývá mezilaboratorní variabilita v barvení, což ztěžuje nalezení podobných hodnot mezi jednotlivými studiemi²³.

Histologická kritéria jsou založena hlavně na práci Perryho a kolegů, kteří prokázali, že recidiva souvisí s cytomorfologickými a histomorfologickými rysy. Každá varianta je diagnostikována podle histologické morfologie¹⁹. Mnoho meningiomů vykazuje smíšenou histologii u stejného nádoru, takže se diagnostikuje tzv. dominantní histologie. Atypické meningiomy jsou diagnostikovány přítomností 4-19 mitóz (poměr mezi počtem buněk v populaci procházející mitózou k celkovému počtu buněk v populaci) na 10 vysoce výkonných polích (HPF = 0,2 mm²), důkazem mozkové invaze nebo alespoň třemi z pěti následujících rysů: hypercelularita (vysoká buněčnost), tvorba malých buněk (vysoký poměr jádro : cytoplazma), vrstvení, výrazně větší jádro a náhodná nekróza²⁴.

U maligních meningiomů diagnostikujeme výrazně zvýšenou mitotickou aktivitu (více jak 20 mitóz na 10 HPF) a ztrátu diference²⁴. Pacienti s maligními meningiomy vykazují špatnou prognózu s opakujícími se metastázami i mimo CNS (např. lymfatické uzliny, játra, ledviny a pankreas)^{11,25}.

1. Benigní meningiomy (obr. 1 na další straně) jsou rozpoznávány dle WHO podle svého subtypu a nedostatku maligních rysů¹¹:

- meningoteliální (A),
- fibrózní (B),
- tranzitní (C),
- psamomatozní (D),
- sekreční (E),
- angiomatický (F),
- mikrocystický (G),
- bohatý na lymfoplasmacyty (H),
- metaplastický (I).



Obr. 1: Subtypy benigních meningiomů dle WHO.

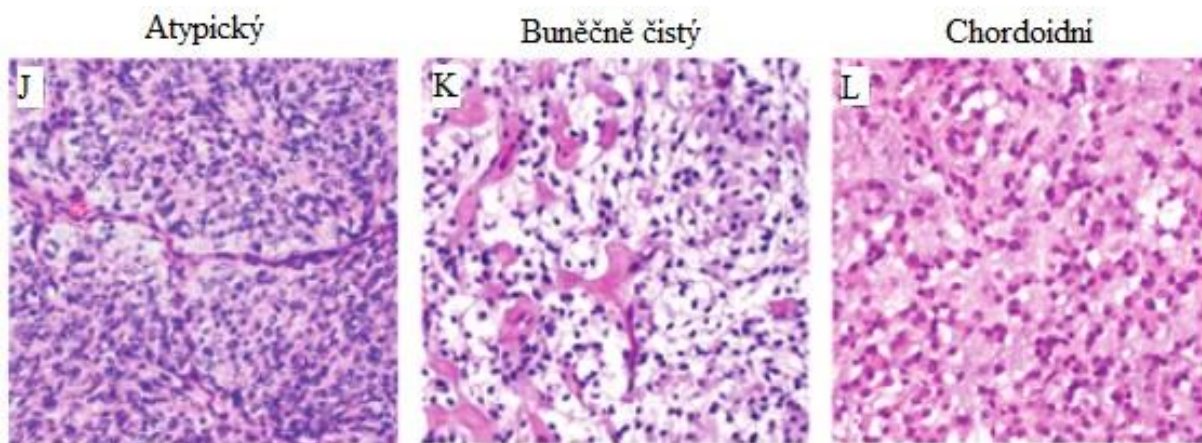
Na obrázku lze vidět devět subtypů benigních meningiomů (barvení HE, zvětšení 20x). Meningiomy (A) složeny z jednotných nádorových buněk. Meningiomy (B) se skládají z vřetenovitých buněk, podobajících se fibroblastům. (C) kombinují rysy podtypu A a B. (D) vytváří vrstvy, které mají tendenci tvořit soustředné kalcifikace (psamoma – písčité vzhled) a na základě toho vytvářet hrubý vzhled. (E) se vyvíjí v meningeotheliálním nebo tranzitním meningiomu. (F) mají často kapilární cévy obklopeny bublinovými nebo pěnovými nádorovými buňkami. (G) mají pavučinový vzhled díky mezibuněčné tekutině. Mají pokročilou formu epiteliální diferenciace. (H) jsou charakterizovány hustými infiltráty lymfocytů a plazmatických buněk. (I) mají cytoplazmatickou akumulaci tuku a tvorbu vakuol^{19,26}.

(Obrázek z: Bi, W. L. et al. *J. Neurosurg.* **2016**, 125 (3), 525–535. <https://doi.org/10.3171/2015.6.JNS15591>.)

Benigní meningiomy bývají ve většině případů diagnostikovány pomocí MRI a CT. Mezi nejčastěji diagnostikované patří meningoteliální, fibrózní a tranzitní meningiomy²⁶. Obvykle se benigní nádory vyskytují jako kulaté nádory, s těsným kontaktem k tvrdé mozkomíšní pleně. Díky injekčnímu podání kontrastní látky (př. gadolinium) dochází k silnému zvýraznění nádoru²⁷.

2. Atypické meningiomy (obr. 2) jsou definovány jedním nebo více kritérií¹¹:

- atypický (J), buněčně čistý (K) nebo chordoidní (L) histologický subtyp buněk,
- infiltrace mozku,
- hypercelularita,
- malé buňky s vysokým poměrem jader k cytoplazmě,
- prominentní jádro (viditelná jádra objektivem 10x),
- nekróza.



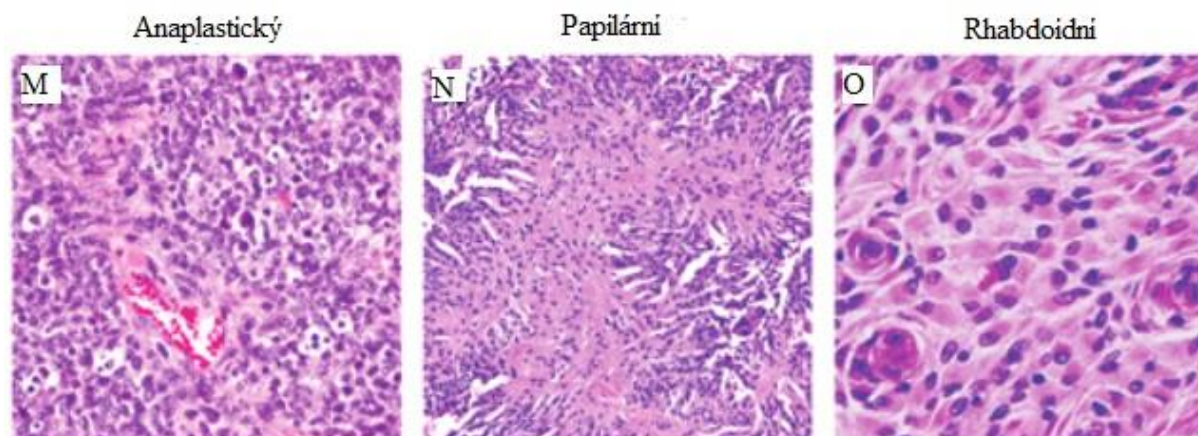
Obr. 2: Subtypy atypických meningiomů dle WHO.

(J) vykazují jadernou atypii a jsou například definovány vysokým mitotickým indexem. (K) bývá vzácný a vyskytuje se zejména v mladším věku (kojenci, děti, mladí dospělí). Výrazným rysem je hyalinizace (tuhé vazivo se sklonem ke kalcifikaci). (L) jsou vzácné (0,6 % meningiomů) a mají podobnost s kostním nádorem. Nádor má nejasnou lalokovitou podobu a buňky jsou uspořádány do stuh nebo kordů^{19,26}.

(Obrázek z: Bi, W. L. et al. *J. Neurosurg.* **2016**, 125 (3), 525–535. <https://doi.org/10.3171/2015.6.JNS15591>.)

3. Maligní meningiomy (obr. 3) jsou definovány¹¹:

- anaplastický (M), papilární (N) nebo rhabdoidní (O) subtyp buněk,
- maligní cytologie připomínající karcinomy, melanomy,
- 20 nebo více mitóz.



Obr. 3: Subtypy maligních meningiomů dle WHO.

(M) mají nekrózy a vyšší počet mitóz, jsou víceméně vřetenové nebo bohaté na kolagen. (N) patří také mezi vzácné subtypy a vyskytují se převážně u dětí. (O) jsou vzácné (< 1 % meningiomů), obsahují velká vezikulární jádra a hustou eozinofilní cytoplazmu.

Obrázek z: Bi, W. L. et al. *J. Neurosurg.* **2016**, 125 (3), 525–535. <https://doi.org/10.3171/2015.6.JNS15591>.)

Maligní meningiomy bývají nepravidelného tvaru a vykazují vyšší objem mozkové krve než nádory benigní a atypické. Dochází u nich často k rekurenci a mohou metastazovat. Obsahují vysoký podíl mutací NF2²⁷.

3.1.2 Léčba

K terapii pacientů s meningiomy se přistupuje individuálně, jelikož povaha meningiomů a možné důsledky různých léčebných postupů se velmi liší. Nejčastější léčbou je metoda „watch and wait“, neurochirurgie a radioterapie. Pokud meningiom pacienta nijak neohrožuje, lze ho sledovat na základě pravidelných klinických MRI testů, po počátečním intervalu pozorování každých 6 měsíců²⁷. U meningiomů, které rostou a ovlivňují život pacienta, dochází k resekci.

Chirurgická léčba je pro většinu pacientů jedinou potřebnou léčbou, ale její dlouhodobé následky jsou často přehlíženy. Bylo uvedeno, že 40 % pacientů, kteří podstoupili chirurgický zákrok, měli po operaci kognitivní nebo emoční problémy (např. úzkost nebo deprese)^{17,27}.

Celková resekce vede k chirurgickému odstranění nádoru včetně mozkové pleny. Resekce je spojována s vyšší šancí na přežití, ale bohužel ji nelze provést u více než 50 % nových případů meningiomů¹⁷. Resekce je omezena například špatnou lokalizací nádoru, zapojením blízkých žilních dutin, tepen a lebečních nervů²⁸. Rozsah resekce je definován hodnotou Simpson grade (I – V)²⁹. Čím je hodnota Simpson vyšší, tím je rozsah resekce nižší a je větší

pravděpodobnost rekurence. Přestože Simpson grade předchází modernímu neuroimagingu, stále se ukazuje jako cenný prognostický faktor. Po operaci se do 48 hodin nebo po 3 měsících provádí MRI, aby se zabránilo artefaktům. U vyšších WHO gradů je třeba co nejradikálnější chirurgická resekce a následná radioterapie²⁷. Radiační terapie je běžným standardem při léčbě meningiomů a snižuje pravděpodobnost recidivy. Radiační terapie závisí na velikosti nádoru, stadiu nemoci a gradu. Pokud meningiom nelze resekovat (př. špatné umístění, vysoký věk), volí se právě radiační terapie. Jestliže meningiom recidivuje nebo dojde k progresi, je přistoupeno k chirurgickému zákroku a následné radiační terapii. Při radioterapii se používá elektromagnetické záření a často se nelze vyhnout vedlejším účinkům (př. ztráta zubů, alopecie a bolesti hlavy)¹⁷.

Mezi systémovou léčbu patří cytotoxická nebo cílená terapie. Obě strategie léčby byly podávány pacientům s pokročilými nebo neresekovatelnými nádory, které byly v mnoha případech dříve léčeny různými chirurgickými a radiačními postupy. Cílená terapie se zaměřuje na inhibici hormonálních receptorů, angiogenezi a signalizaci růstového faktoru¹⁷. Jedná se spíše o doplňkovou terapii u progresivních meningiomů²⁸.

Pokud pomocí zobrazování zjistíme jasné onemocnění meningiome, není potřeba histologické ověření. Doporučuje se však vyloučení vzácných diferenciálních diagnóz (metastáz)²⁷. Stanovení diagnostické a terapeutické role molekulárního profilování vyžaduje dostupnost nádorové tkáně²⁷.

3.1.3 Identifikace a charakterizace genetických a molekulárních změn

V posledních letech došlo u meningiomů k pokrokům při identifikaci, charakterizaci genetických a molekulárních změn a jejich spojení s chováním nemoci⁸.

1 Změny na úrovni chromozomů

U meningiomů dochází ke genetickým změnám na chromozomu 22. Na dlouhém rameni chromozomu 22 se nachází nádorový supresorový gen neurofibromatózy typu 2 (NF2). NF2 je autozomálně dominantní gen, jehož ztráta exprese vede k nádorovým onemocněním nervového systému, nejčastěji k tvorbě meningiomů. Frekvence mutace NF2 je přibližně u všech stupňů meningiomů stejná^{8,30}. Produktem genu NF2 je protein merlin (schwannomin, neurofibromin 2), který byl poprvé objeven roku 1993³¹. Jedná se o membránový receptor, který zpracovává signály z extracelulární matrice a přenáší je k proteinům uvnitř buněk³¹. Podílí se na regulaci buněčného růstu a proliferaci. Mutace NF2 vedou ke zkrácenému nefunkčnímu proteinu merlin a dochází k nekontrolovatelné buněčné

proliferaci^{8,31}. Ztráta chromozomu 22 se vyskytuje u 60-70 % všech meningiomů²⁴. Na chromozomu 22 byly dále zjištěny změny genů BAM22, BCR a tkáňové inhibitory metaloproteináz (TIMP). TIMP regulují matricové metaloproteinázy (MMP), a také buněčnou proliferaci, apoptózu a angiogenezi⁸.

Další nejčastější chromozomální změnu v meningiomech představuje monozomie chromozomu 14, jedná se o geny NDRG2, MEG3 a AKT1. Nejčastěji jsou geny na chromozomu 14 spojovány s tumorigenezí a rekurencí⁸. Další genetické změny se vyskytují na chromozomech 6, 9, 10, 17 a 18. Mezi nejčastější gen asociovaný s tumorigenezí patří CDKN2 na chromozomu 9⁸.

Změna na chromozomu 14 je přítomna v 31 % benigních meningiomů, 40-70 % v atypických a až 100 % v maligních. Z hlediska prognózy byl chromozom 14 identifikován jako prognostický indikátor recidivy nádoru, hlavně u vyšších stupňů meningiomů. Z toho důvodu se předpokládá, že oblast 14q32 je relevantní pro progresi meningiomů⁸. V této oblasti pak Zhang⁷ a jeho kolegové identifikovali gen MEG3, který je vhodným supresorem, použitelným jako biomarker⁸.

2 Epigenetické změny

Epigenetické abnormality patří k zásadním genetickým změnám. Jedná se o dědičné změny, které ovlivňují genovou expresi bez změny sekvence DNA. Metylace a abnormální exprese miRNA se podílejí na vzniku meningiomů, ale jakým způsobem není zcela známo. Metylace DNA přesněji odráží chování nádoru a predikují lépe recidivu, než hodnoty WHO a Simpson gradů^{24,32}.

Gen, který souvisí s epigenetickými regulacemi, je inhibitor metalopeptidázy TIMP (TIMP3). TIMP3 se vyskytuje v blízkosti genu NF2, což je oblast, která je v meningiomech deletována. Studie ukázala alelické ztráty na 22q přesahující TIMP3 u 51 % meningiomů. U agresivnějších typů meningiomů, které měly silnou metylaci TIMP3, byla zjištěna nižší hladina exprese mRNA TIMP3³³. Dalším genem je p14ARF. Váže se na onkogen MDM2, indukuje degradaci proteinu MDM2 a brání degradaci p53. Díky metylaci docházelo často u nádorů mozku k inaktivaci této dráhy³².

Gen serin-threonin kinázy (WNK2) pomocí mitogenem aktivované kinázy 1 (MEK1), negativně reguluje signální dráhu receptoru epidermálního růstového faktoru (EGFR).

Hypermetylace vede k buněčné proliferaci nádorových buněk. Studie ukazují, že gen WNK2 byl metylován u 83 % atypických a 71 % maligních meningiomů³².

MiRNA se podílejí na fyziologických a patologických procesech. Jedná se o malé nekódující RNA o asi 22 nukleotidech. Inhibují translaci cílové mRNA pomocí antisense mechanismu. Studie ukazují, že miRNA hraje roli v proliferaci, apoptóze, tumorigenezi a buněčné diferenciaci. Byla zkoumána asociace mezi meningiomy a expresí miRNA-21, miRNA-107, miRNA-137 a miRNA29b. Pouze miRNA-21 má vyšší hladinu u atypických a maligních meningiomů než u benigních. Může se tedy chovat jako onkogen^{24,32,34}.

Vysoká miRNA exprese u miRNA-190a a nízká exprese miRNA29c-3p, miRNA-219-5p je spojena s vyšší mírou recidivy u pacientů s meningiomy^{32,35}. Tyto miRNA by se mohly stát v meningiomech novými prognostickými indikátory.

3.2 Dlouhé nekódující ribonukleové kyseliny (lncRNA)

Jedná se o genetické oligonukleotidy, které jsou složeny ze čtyř nukleotidů. Jednotlivé nukleotidy se skládají z kyseliny fosforečné, ribózy a nukleových bází (adenin, guanin, cytosin a uracil). Jsou to dusíkaté heterocyklické sloučeniny, připojené pomocí N-glykosidové vazby. Kyselina fosforečná se váže na 5' konec nukleotidu a na ribózu^{36,37,38}.

RNA se objevuje v organismech v různých formách a každá má jinou roli. Rozdělují se na kódující a nekódující RNA. Nekódující RNA se odlišují od kódujících nemožností překlada do proteinu. Mezi kódující patří mRNA, do nekódujících můžeme zařadit všechny ostatní RNA s regulační funkcí. Jelikož je experimentální část této práce věnovaná výhradně nekódujícím RNA, budou v následujícím textu blíže specifikovány.

Genom je velmi komplexně organizovaný, ale pouze 2 % genomu jsou převedena do proteinu³⁹. Do 21. století bylo zbylých 98 % bráno jako „junk DNA“ bez žádné zjevné funkce^{1,40,41,42} a nekódující DNA se až poté stala zdrojem informací různých nekódujících RNA (tRNA, rRNA a regulační RNA)⁴⁰.

Dlouhé nekódující RNA si získaly velkou pozornost jako klíčové a potencionální biologické regulátory a zapadají do kontextu celého výzkumu DNA v 50. letech 20. století^{43,44,45}. Podílejí se na vývojových procesech a nemocech, ale mechanismy působení jsou stále málo prozkoumané. Mohou být využity jako biomarkery a molekulární cíle léčiv, například u nádorových onemocnění. Dobře prozkoumané lncRNA poskytly důležité informace a daly prostor pro další detailnější výzkum¹.

Dlouhé nekódující RNA jsou nejčastěji exprimovány pouze v malém množství^{46,47,48}. Výzkum však ukazuje, že lncRNA hraje významnou roli v široké škále důležitých biologických procesů^{49,50}, včetně transkripce^{51,52}, sestřihu^{53,54}, translace^{55,56}, lokalizace proteinu^{57,58}, celistvosti buněčné struktury^{58,59}, buněčném cyklu^{60,61}, apoptóze^{62,63} a dalších⁵⁰. Značný počet lncRNA je na 3' konci polyadenylovaný a na 5' konci zakončený metylguanositovou čepičkou⁶⁴.

Díky databázi NONCODE jsme schopni získat cenná data k jednotlivým lncRNA. Databáze obsahuje v současné době necelých 74 000 lncRNA^{65,66}. Pomáhá rozdělit lncRNA do skupin pro lepší porozumění základních mechanismů působení, formulaci nových hypotéz a poskytování poznatků o rozdílech jednotlivých tříd nekódujících RNA⁶⁵. NONCODE však

není jedinou databází a v současné době existuje také lncRNADB^{67,68,69}, která poskytuje celkovou charakteristiku a podrobné informace o známých lncRNA. Další databází je LNCipedia^{70,71} sloužící k získávání informací o sekvenci a struktuře lidské lncRNA. Databáze ChIPBase⁷² pomáhá studovat vazebné místo a motivy transkripčního faktoru pro regulaci exprese lncRNA.

3.2.1 Klasifikace lncRNA

Dlouhé nekódující RNA jsou klasifikovány podle struktury, funkce, lokalizace, metabolismu a interakcí s protein-kódujícími geny.

- Cis- a trans- regulační činnost

Přirozené antisense transkripty (NATs) patří do specifické kategorie RNA, které jsou komplementární s jinými RNA transkripty. Dělí se na trans- a cis- NAT. Trans-NAT a jejich příslušné cíle jsou umístěny v různých lokusech na genomu, jako miRNA. Cis-NAT jsou na stejném lokusu, ale na opačném řetězci DNA. Cis-NAT páry vytváří dokonalou komplementaritu, zatímco páry trans-NAT vykazují nedokonalou komplementaritu a mohou vytvářet komplexní regulační síť⁷³. Cis-NAT byly poprvé identifikovány ve virech⁷⁴, následně v prokaryotech⁷⁴ a nakonec v eukaryotech^{75,76}. Interakce sense a antisense transkriptů naznačuje roli NAT v regulaci genové exprese. V případě tvorby RNA hybridů může vyvolat umlčení genu nebo vyvolat imunitní odpověď^{74,77,78}

lncRNA se dělí dle lokalizace v genomu na intergenní/intronovou lncRNA a sense/antisense lncRNA, jak lze vidět na obr. 4. Současné studie se nejvíce soustřeďují na výzkum intergenní a antisense lncRNA^{46,79}.

Dělení:

- Intergenní a intronová lncRNA

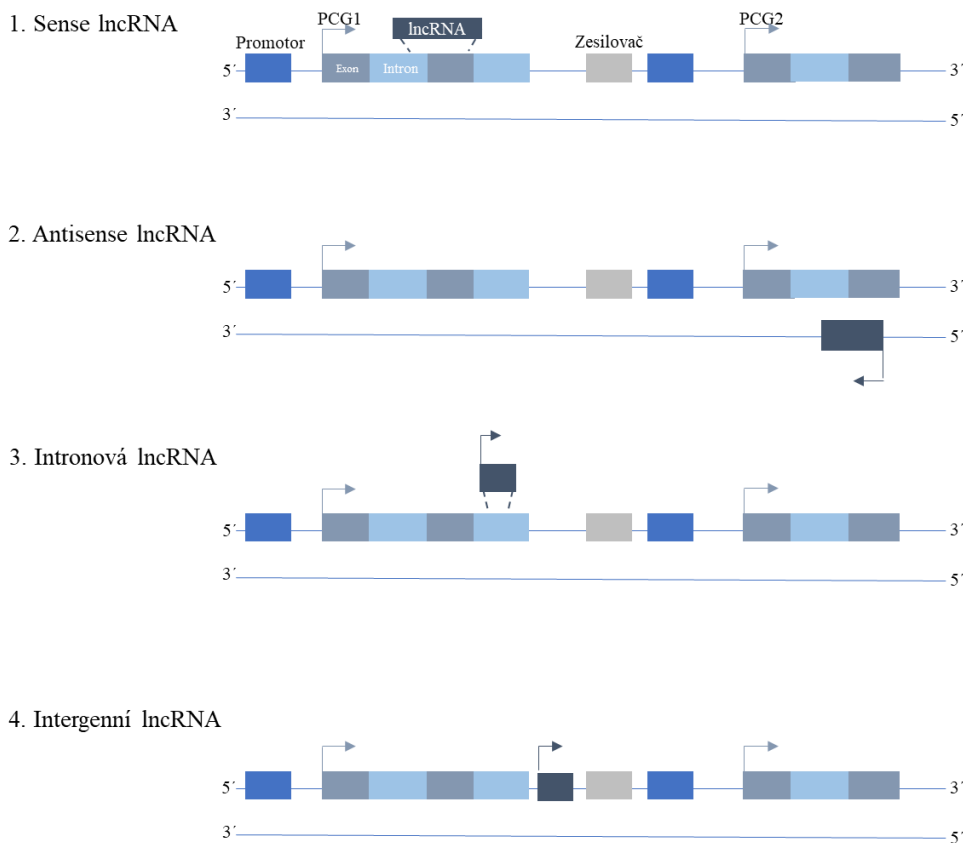
Intergenní lncRNA je lokalizována mezi dvěma kódujícími geny. Intronová lncRNA je transkribovaná z intronů protein kódujících genů a pravděpodobně je generována v důsledku alternativního sestřihu. Není neobvyklé, že intronová lncRNA obsahuje některé exonové sekvence a poly(A) modifikace⁸⁰. S největší pravděpodobností jsou oba typy lncRNA regulovány pomocí různých mechanismů aktivace p53 a mohou sloužit jako prekurzory pro jiné typy ncRNAs, například miRNA. Lépe jsou

prozkoumané intergenní lncRNA, které fungují na různých regulačních principech – transkripční regulace (cis nebo trans) a kontrola translace^{40,81}.

- Sense a antisense lncRNA

Antisense lncRNA se přepisuje z nepřepisovaného řetězce protein-kódujícího genu. Antisense lncRNA může působit v cis i trans mechanismu a bude tak regulovat expresi jiných genů. Antisense lncRNA častěji působí v cis formě kvůli blízkosti jejich překrývajících sense genů. Sense lncRNA jsou protein-kódující řetězce, které obsahují exony. Mohou se překrývat s částí nebo pokrývají celou sekvenci protein-kódujícího genu. Antisense lncRNA reguluje sense mRNA sestřih. Antisense geny se mohou posttranskripčně vázat k sense mRNA a zvyšovat jejich stabilitu⁸². Podle databáze GENCODE⁴⁶ se může antisense lncRNA vyskytovat ve třech variantách:

- transkripty z antisense řetězce překrývají exonovou část genu pomocí exonů lncRNA
- transkripty z intronu sense genu se s tímto genem nepřekrývají
- transkripty pokrývají celou sekvenci genu



Obr. 4: Klasifikace lncRNA podle lokalizace v genomu.

Klasifikace jednotlivých dlouhých nekódujících RNA (lncRNA) podle orientace v genomu a orientace k protein-kódujícím genům (PCG). LncRNA se rozdělují do čtyř základních skupin. Sense překlenují více exonů nebo intronů v PCG. Antisense jsou transkribovány z opačného řetězce. Intronické jsou umístěny v jednom z intronů a intergenní jsou umístěné mezi dvěma PCG.

(Upraveno podle <https://www.ahajournals.org/doi/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023686>)

3.2.2 Funkce lncRNA

Rozdělení lncRNA slouží k porozumění možných společných mechanismů a dělí se do čtyř skupin. Jednotlivé skupiny jsou shrnuty na obr. 5. Některé lncRNA mohou splňovat podmínky pro více skupin.

1. Signály (Signals)

- Jedná se o lncRNA, které jsou exprimovány pouze v konkrétním čase a místě pro zpracování různých podnětů. Mohou interagovat s enzymy modifikující chromatin a následně umlčovat geny prostřednictvím blokady transkripce nebo tvorby heterochromatinu⁸³.

- Například KCNQ1ot1 a Air zprostředkovávají transkripční umlčení více genů interakcí s chromatinem⁸⁴.

2. Návnady (Decoys)

- Hlavní rolí lncRNA je regulace transkripce. Jejich funkcí je regulace faktorů, které vedou k potlačení transkripce⁸⁵. Modulují genovou expresi sekvencí proteinů vázajících RNA, transkripčních faktorů a miRNA⁸⁶.
- Příkladem je lncRNA Gas5, která je indukována růstovým faktorem za podmínek hladovění. Při hladovění dochází k indukci Gas5 a slouží jako návnada k uvolnění transkripčního faktoru z DNA, aby se zabránilo transkripci metabolických genů.⁸⁶
- Dalším příkladem je PANDA, která se váže na transkripční faktor NF-YA. Dochází tak k zabránění apoptózy zprostředkované pomocí p53.⁸⁷

3. Průvodci (Guides)

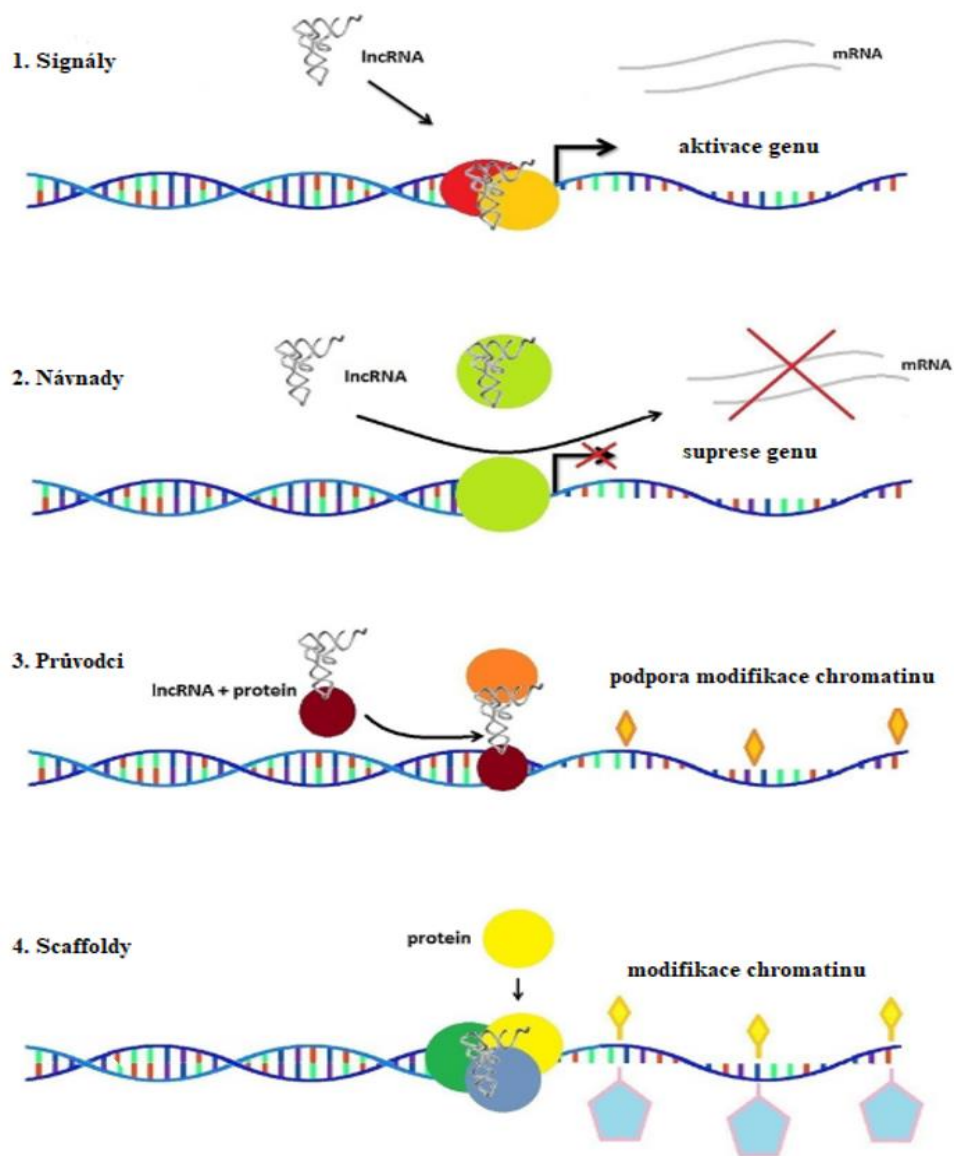
- Tyto lncRNA slouží ke správné lokalizaci/organizaci specifických proteinových komplexů. Transkripty se váží na regulační nebo enzymaticky aktivní proteiny, což jsou transkripční faktory a modifikátory chromatinu, aby je nasměrovaly na přesná místa v genomu. Specifické cílení je stimulováno pomocí RNA-DNA, RNA-RNA a RNA-proteinových interakcí^{79,84}. Bez ohledu na vzdálenost nebo mechanismus (cis nebo trans), princip lncRNA jako průvodce zůstává stejný, předávat regulační informace přes intervenující úsek DNA pro kontrolu exprese cílového genu, což vede k epigenetickým změnám v genomu (epigenomu)^{84,86}.
- Příkladem může být lincRNA-p21, která je indukována proteinem p53 po poškození DNA. Následně se lincRNA-p21 váže na jaderný faktor, aby přesměrovala protein p53 na specifické promotory.

4. Skelety (Scaffolds)

- Tato skupina se řadí mezi nejsložitější dlouhé nekódující RNA. LncRNA může sloužit jako adaptér pro přeměnu dvou nebo více proteinových partnerů. Vytváří tedy centrální platformy, na nichž jsou shromážděny relevantní molekulární komponenty. V mnoha biologických signalizačních procesech je tato charakteristika přesné kontroly životně důležitá pro správné řízení specifičnosti a dynamiky intramolekulárních interakcí a signalizačních událostí^{84,88}. Celková koncepce RNA scaffoldu je globálnější, protože

byly identifikovány stovky lncRNA, které vytvářejí interakce mezi ribonukleovými proteiny s více proteinovými partnery.

- TERC telomeráza je příkladem scaffoldu, která sestavuje komplex telomerázy a udržuje konce telomer. Kombinuje aktivitu reverzní transkriptázy s proteiny zaměřující se na telomeru v jednom ribonukleoproteinu (RNP)⁸⁶.



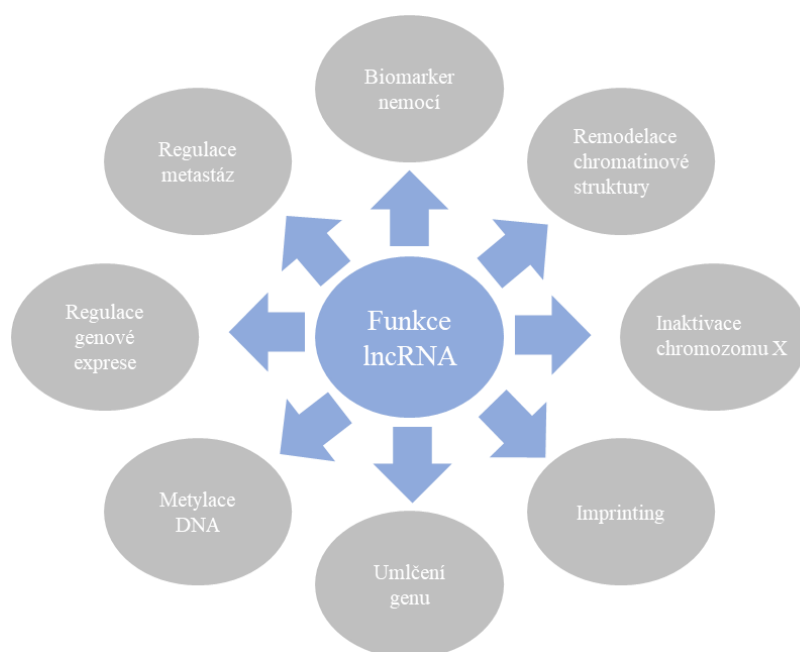
Obr. 5: Klasifikace lncRNA podle funkce.

1. První skupina funguje jako signály biologických procesů a vedou k aktivaci transkripce specifických genů.
2. Návnady se chovají jako modulátory proteinových faktorů, například transkripčních faktorů.
3. Průvodci fungují jako vodítka pro ribonukleoproteinové komplexy a podporují chromatinovou modifikaci cílových genů.
4. Scaffoldy vedou k transkripční aktivaci nebo represí.

(Upraveno z: Kolenda, T. et al. *Reports Pract. Oncol. Radiother.* **2017**, 22 (5), 378–388. <https://doi.org/10.1016/j.rpor.2017.07.001>)

3.2.3 Biologická role lncRNA: asociace s nemocemi

Dlouhé nekódující RNA hrají velkou roli v biologických procesech a interakcích s DNA, RNA i proteiny. Jsou spojeny s modifikacemi histonů, regulací genové exprese a umlčováním genů. Mutace v lncRNA jsou spojeny s různými nemocemi včetně virové infekce, rakoviny a neurodegenerativních poruch. Pokud dojde v lncRNA k jakékoli dysregulaci, dochází k ovlivnění buněčné funkce včetně buněčné proliferace, odolnosti vůči apoptóze, indukci angiogeneze a vypnutí nádorových supresorů⁸⁹. Jednotlivé funkce, na kterých se lncRNA podílí, jsou zobrazeny v obr. 6.



Obr. 6: Jednotlivé funkce dlouhých nekódujících RNA.

(Upraveno z: Dhanoa, J. K. et al. *Journal of Animal Science and Technology*. 2018, pp 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0183-7>.)

V 90. letech 20. století bylo zjištěno, že lncRNA jsou zapojeny v epigenetické regulaci genů (např. Xist a H19). Xist (X-inaktivní specifický transkript) je lncRNA a souvisí s inaktivací chromozomu X (XCI), která vyrovnává genovou expresi mezi mužskými a ženskými buňkami. Dochází tedy k inaktivaci jednoho ze dvou X v ženských buňkách. Xist leží v oblasti chromozomu X, nazývané jako X inaktivační centrum (Xic). Centrum obsahuje shlukované geny a regulační sekvence, které jsou zapojené do inaktivace X. Transkript Xist pokrývá chromozom X v cis-NAT a umlčuje chromozomální gen X^{90,91}. Mechanismus, kterým Xist iniciuje inaktivaci chromozomu X, není zatím detailněji prozkoumán. Xist může hrát roli

v nádorových onemocněních, ale dosud není jeho role více popsána⁹². H19 je lokalizován na lokusu Beckwith-Wiedemannového syndromu (BWS). BWS je autozomálně dominantní syndrom s predispozicí k rakovině o prevalenci přibližně 1 z 10 000 živě narozených dětí. BWS vede k zvýšenému výskytu dětských nádorů v první dekádě života⁹³ a různým anomáliím, například defektům břišní stěny, hypoglykemií nebo anomáliím uší⁹⁴. H19 je silně exprimován během embryogeneze. H19 je exprimován z mateřské alely a sousední gen IGF2 (insulin-like growth factor 2) z otcovské. Geny H19 a IGF2 jsou exprimovány ve stejných tkáních a mají spolu úzce koordinovanou expresi. Nejčastěji se vyskytují v endodermu během embryonálního vývoje. Oba geny mají silně omezenou regulaci ve všech tkáních, kromě kosterních svalů⁹⁵. Experimenty ukazují, že před narozením je mateřská alela IGF2 stejně nebo více metylovaná než otcovská alela. Po narození je otcovská alela více metylovaná než mateřská⁹⁶. H19 slouží jako návnada pro miRNA a reguluje její dostupnost a aktivitu. Protein p53 potlačuje H19 a miR-675, odvozená z H19, inhibuje expresi proteinu závislou na p53⁷⁹.

LncRNA hrají roli v regulaci buněčného cyklu, přežití, imunitní odpovědi a přispívají k transformovanému fenotypu rakovinných buněk. LncRNA jsou odlišně exprimovány v nádorech a jsou spojeny s iniciací růstu nádoru, tvorbou metastáz a vedou k nižší či vyšší pravděpodobnosti přežití pacientů s určitým typem onemocnění. Studie ukazují, že lncRNA mohou působit jako onkogeny nebo nádorové supresory. Onkogenní lncRNA zahrnují H19, HOTAIR, XIST a další. Molekuly transkriptu HOTAIR jsou nadměrně exprimovány u různých nádorových onemocnění (např. karcinomu prsu a karcinomu plic). HOTAIR a BRCA1 jsou interakčními partnery a mohou mít konkurenční roli v genové expresi. HOTAIR indukuje degradaci proteinu prostřednictvím E3 ubikvitin ligázy. Mezi nádorové supresory patří například MEG a TERRA. TERRA interaguje s telomerami spojenými s TRF1, TRF2 (telomere repeat factors 1 a 2), ORC (origin recognition complex) a usnadňuje tvorbu heterochromatinu v telomerách. TRF1, TRF2 a podjednotky ORC jsou proteiny, které vytváří vysoce afinitní kontakt s telomerickou DNA. TRF1 negativně reguluje délku telomery a podporuje replikaci telomer. TRF2, kromě regulace délky telomery, chrání i konce chromozomů. LncRNA také potlačují hladiny miRNA, čímž se zvyšuje exprese cílového genu. Snížení aktivity miRNA u nádorových onemocnění ovlivňuje buněčný cyklus, apoptózu a proliferaci^{79,97}. Pro správnou diagnostiku nádorového onemocnění a následnou cílenou terapii je důležité porozumět každé lncRNA podrobně a to identifikací buněčných funkcí, porozuměním molekulárních mechanismů a pochopit jejich roli u dané nemoci⁷⁹.

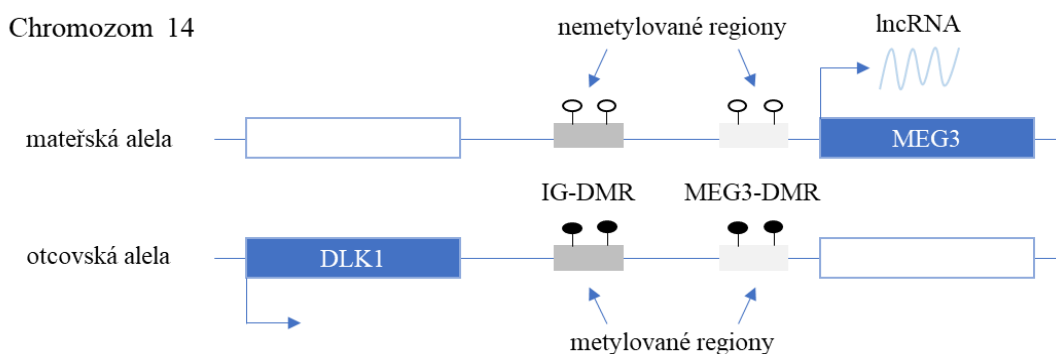
3.2.4 LncRNA jako biomarkery

LncRNA jsou exprimovány u různých typů nádorových onemocnění a fungují jako onkogeny nebo nádorové supresory. Dlouhé nekódující RNA jsou v tělních tekutinách stabilní a lze je detekovat v plazmě nebo v moči⁹⁸ pacientů s nádorovým onemocněním. Takováto detekce lncRNA je neinvazivní a lze je použít jako biomarkery nebo terapeutické cíle pro léčbu rakoviny⁹⁹⁻¹⁰¹. LncRNA by mohly být použity při hodnocení nádorových onemocnění v následujících aspektech:

- rozlišování pacientů s nádorovým onemocněním v rané fázi od zdravých lidí s vysokou senzitivitou a specificitou,
- predikce pacientů s nádorem,
- předpověď rizika recidivy nádorů a tvorby metastáz po chirurgickém zákroku,
- jako hodnotící index, zda byl chirurgický zákrok úspěšný či nikoliv⁹⁹.

3.3 MEG3 (Maternally expressed gene 3)

Lidský chromozom 14 nese mateřsky exprimovaný gen MEG3 a otcovsky exprimovaný gen DLK1 (obr. 7). Genomický imprinting je mechanismus, ve kterém exprese genu závisí na jeho rodičovském původu¹⁰². Savčí buňky se vyznačují tím, že mají dvě sady chromozomů, z nich jedna je zděděná po matce a druhá po otci. Obě kopie každého genu mají stejný potenciál exprese i represe. U genů regulovaných genomickým imprintingem dochází k expresi jednoho ze dvou chromozomů. MEG3 je imprintovaný gen, který se skládá z 10 exonů. Kóduje přibližně 1,6 kb dlouhou nekódující RNA. MEG3 byl identifikován u myši jako homolog Gtl2^{103,2}. MEG3/Gtl2 patří do lokusu DLK1-MEG3, který leží na chromozomu 14q a u myši na chromozomu 12q³. MEG3 a DLK1 se nacházejí 90 kb od sebe na již zmíněném chromozomu 14. DLK1 je zapojený do buněčné signalizace a diferenciaci. Bylo zjištěno, že absence exprese DLK1 koreluje se ztrátou diferenciací schopnosti a zvýšenou malignitou¹⁰⁴. DLK1 je spojen s výzkumem myši, kde se podílí na časném embryonálním vývoji, postnatálním růstu a ukládání tuku¹⁰⁵. DLK1 je otcovsky exprimován a kóduje protein, patřící do rodiny proteinů, podobných růstovému faktoru. MEG3 je mateřsky exprimován a produkuje lncRNA¹⁰⁴. Díky TATA boxu v genovém promotoru a RNA transkriptu s poly(A) koncem, je MEG cílovým genem RNA polymerázy II¹⁰⁶. Genová exprese regionu DLK1-MEG3 je pevně regulována imprintovanými kontrolními regiony (ICR). Kontrolní region (ICR) lokusu DLK1/MEG3 je metylovaný region, známý jako IG-DMR¹⁰². Kromě regionu IG-DMR existuje ještě druhý metylovaný region, MEG3-DMR^{105,107}. IG-DMR je nemetylovaný na mateřské alele a hypermetylovaný na otcovské alele chromozomu. Ztráta exprese MEG3 u nádorových onemocnění nesouvisí s genomickými abnormalitami, jako je delece genu nebo mutace. Ztráta exprese genu MEG3 je spíše připsána promotoru genu MEG3 a hypermetylaci enhanceru. MEG3 je tedy gen, jehož ztráta exprese může hrát rozhodující roli při tvorbě nádoru¹⁰⁸. U pacientů byly nalezeny odlišné fenotypy s otcovskými nebo mateřskými uniparentálními chorobami pro chromozom 14, kde je umístěn homolog MEG3. Zvýšená exprese MEG3 u obou chromozomů 14 od matky vede například ke zpomalenému růstu, vývojovému zpoždění nebo i poruchám motoriky¹⁰⁹.



Obr. 7: Diagram *DLK1-MEG3* lokusu.

Region *DLK1-MEG3* obsahuje imprintované kontrolní regiony *IG-DMR* a *MEG3-DMR*, který se překrývá s promotorem genu *MEG3*. Oba kontrolní regiony jsou metylované na otcovské alele.

(Upraveno z: Kameswaran, V.; Kaestner, K. H. The Missing Lnc (RNA) between the Pancreatic β -Cell and Diabetes. **2014**, 5 (July), 1–10. <https://doi.org/10.3389/fgene.2014.00200>.)

V lidském organismu je *MEG3* exprimována například v centrálním nervovém systému (mozek a mícha) a nadledvinách. Jeho transkripty jsou detekovány ve vaječniku, varlatech, pankreatu a játrech. Ztráta exprese *MEG3* byla nalezena například v nádorech mozku, plic, děložního čípku, prostaty a jater a vede tvorbě nádorových buněčných linií¹¹⁰. Naopak re-exprese potlačuje růst nádoru a podporuje buněčnou apoptózu⁴. To vedlo k myšlence, že *MEG3* je nádorovým supresorem. Další hypotézy vedou k vzájemnému vztahu mezi *MEG3*, proteinem *p53*, DNA metylací nebo proteinem *Rb*^{3,111}.

3.3.1 *MEG3* a metylace

Metylace je způsob, jak modifikovat genovou expresi beze změny DNA sekvence. Nejvíce studovanou chemickou modifikací nukleotidů je metylace cytosinu a změny spojené s chromatinem (metylace a acetylace histonu). Tyto epigenetické modifikace mohou změnit dostupnost DNA pro transkripční komplex¹¹². Metylace ovlivňuje pouze cytosin, kterému předchází guanosen v 5' směru DNA sekvence. Tato modifikace vede k tvorbě dinukleotidu CpG a ovlivňuje DNA v proximální promotorové oblasti¹¹³. U maligních onemocnění jsou oblasti promotorů nádorových supresorů hypermetylované, což vede k nepřiměřenému transkripčnímu umlčování genů. Tyto geny jsou zapojeny do transkripce, apoptózy, opravy DNA, remodelace chromatinu a regulaci buněčného cyklu. U zdravých buněk k metylaci těchto genů nedochází¹⁰⁴. Hypermetylace u některých nádorových onemocnění v promotorové oblasti je důsledkem ztráty exprese *MEG3*¹¹⁴. Promotorová oblast *MEG3* je bohatá na CpG nukleotidy.

Metylační obrazec je rozdělen do čtyř oblastí a obsahuje celkem 112 CpG dinukleotidů, které se nacházejí před prvním exonem. První a čtvrtá oblast obsahuje funkčně důležité sekvence pro genovou expresi¹¹⁵. IG-DMR na chromozomu 14 obsahuje celkem osm CpG dinukleotidů.

Bylo prokázáno, že metylace u některých nádorových onemocnění vykazovala snížené celkové přežití pacientů, ve srovnání s jedinci bez metylačního stavu. To značí vztah mezi metylací a progresí onemocnění^{104,116,102}.

3.3.2 MEG3 a p53

Nádorový supresor TP53 kóduje jaderný fosfoprotein p53 o velikosti 53 kD¹⁰⁷. Tento protein hraje v nádorové supresi důležitou roli¹¹⁷. MDM2 se váže na p53 a vede k degradaci proteinu p53 skrz ubikvitinační mechanismus. MDM2 a p53 je regulován faktory, které zajistí, zda p53 nebo MDM2 splní svoji funkci¹¹⁸. Inhibice MDM2 prostřednictvím fosforylace, acetylace, a inhibice ubikvitinace, má dopad na aktivitu TP53¹¹⁹. Aktivace proteinu p53, díky aktivitě MEG3 a potlačení MDM2, zastavuje buněčný cyklus nebo vede k apoptóze, diferenciaci a senescenci¹²⁰. MDM2 může být regulován TP53 na úrovni transkripce, proto MDM2 a TP53 tvoří samoregulační zpětnovazebnou smyčku, která je důležitá k udržení poměru MDM2/TP53.

U meningiomů byly nalezeny mutace p53. Bylo prokázáno, že exprese MEG3 aktivuje p53 a stimuluje jeho transkripční aktivitu. Pomocí tohoto testu bylo zjištěno, že MEG3 funguje jako lncRNA. MEG3 aktivuje p53 a zvýší hladinu tohoto proteinu¹²¹. Nádorový supresor p53 následně stimuluje expresi růstového diferenciačního faktoru 15 (GDF15). GDF15 je členem rodiny růstového faktoru β (TGF- β)¹²². Inhibuje proliferaci několika rakovinných buněčných linií a potlačuje tvorbu nádorů^{121,123}. Bylo prokázáno, že GDF15 je cílový gen MEG3 a exprese MEG3 potlačuje proliferaci buněk HCT116³.

MEG3 je i bez p53 schopný inhibovat buněčnou proliferaci. Funkce lncRNA MEG3 jako nádorového supresoru je zprostředkována cestou závislou na p53³. Výsledky u pacientů s akutní myeloidní leukémií (AML) však naznačují, že MEG3 hraje roli nádorového supresoru a potlačuje růst nádoru i cestou nezávislou na p53. Pravděpodobně je tato cesta podpořena signalizační cestou MDM2/Rb^{124,102}.

3.3.3 MEG3 a Rb

Rb je nádorový supresorový gen retinoblastomu, umístěný na chromozomu 13¹²⁵. Rb je zapojen do diferenciaci, senescence, apoptózy a buněčného cyklu¹²⁶. Gen produkuje nukleofosfoprotein pRb a potlačuje růst v G1 fázi^{102,127}.

pRB je regulován fosforylací a defosforylací¹²⁶. pRb je modifikovaný fosforylací za vzniku hyperfosforylovaných forem, které přetrvávají do ukončení mitózy. Fosforylace D-Cdk4/Cdk6 a E-Cdk2 je nezbytná pro inaktivaci pRB vedoucí k pokračování buněčného cyklu¹²⁸. Tato fosforylace způsobuje disociaci Rb od transkripčních faktorů E2F. To umožňuje transkripci genů, potřebných pro S fázi a progresi G2/M¹²⁹. Regulátor p16 (inhibitor CDKN2A), kódovaný genem ink4a, inhibuje komplexy cyklin-cdk v G1 fázi a inhibuje pRb^{129,130}. Nejčastěji anaplastické a maligní meningiomy postrádají protein p16. Až 71 % anaplastických meningiomů postrádalo buď Rb, nebo proteiny p16 a p15 (inhibitor CDKN2B)^{102,131}.

Studie ukázaly, že u AML interaguje MDM2 s Rb. MEG3 podporuje MDM2 degradaci, zvyšuje hladinu Rb a aktivní formu hyperfosforylovaného Rb. Aktivní Rb následně interaguje s transkripčním faktorem E2F. Transkripční faktor E2F, který je výrazně regulován MEG3, negativně reguluje expresi svých cílových genů, konkrétně DNMT3A. Díky tomu je pravděpodobné, že MEG3 inhibuje růst nádoru cestou Rb-DNMT3A¹²⁴. Nadměrná exprese MEG3 vede k zastavení buněčného cyklu v G1 fázi a k nižší pravděpodobnosti vstupu buněk do G2/M fáze^{102,129}.

Přítomnost vyššího procenta hyperfosforylovaného pRb vede k inhibici apoptózy a proliferaci nádoru v meningiomech. Naopak nižší procento hyperfosforylovaného pRb by mohlo vést k apoptóze a snížení růstu nádoru¹³². Výsledky ukazují, že funkce pRb může být v meningiomech inhibována¹³³. Zvýšené hladiny hyperfosforylovaného pRb jsou spojeny s horšími klinickými výsledky a chemorezistencí ve srovnání s pRb běžných hodnot^{102,134}.

3.3.4 MEG3 a izoformy

Lidský gen MEG3 obsahuje deset exonů. Pomocí RT-PCR bylo identifikováno 27 sestříhových variant. Jednotlivé sestříhové varianty se liší ve schopnosti stimulovat cestu p53¹³⁵. Nádorová tkáň exprimuje jiné izoformy než zdravá a liší se rozdílným mechanismem sestříhu. Všechny transkripty MEG3 fungují jako nekódující RNA a nekódují žádné proteiny^{106,136}.

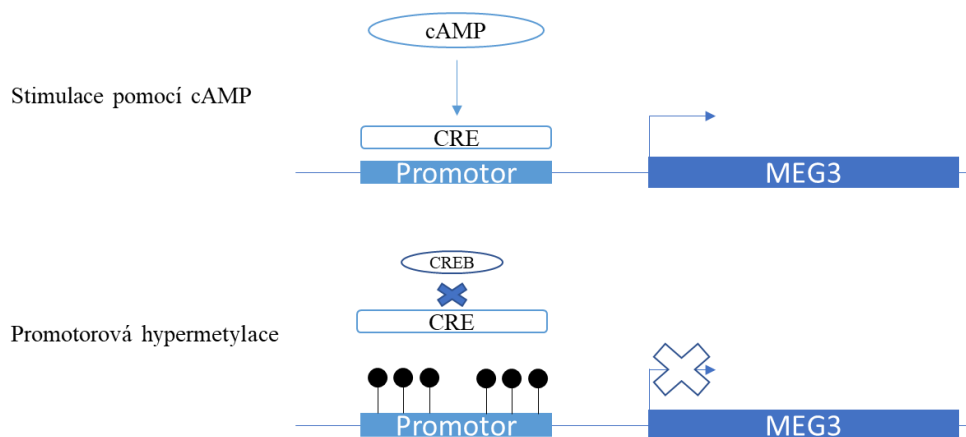
Molekula obsahuje asi 1,6 kb nukleotidů. Je potřeba, aby tvořila kompaktní strukturu a mohla tak plnit svou funkci. Pomocí počítačového programu *mfold* byly analyzovány sekundární struktury MEG3 izoform. Na základě toho bylo zjištěno, že každá izoforma MEG3 obsahuje

tři větvičí se motivy (M1, M2 a M3). Po odstranění vždy jednoho motivu nedošlo ke změně celkové sekundární struktury. Při testování lokálních struktur došlo při delecí M1 ke snížení stimulační aktivity p53 o 30 %. Delece M3 snížila aktivitu o 67 %. Delece M2 téměř úplně eliminuje tuto aktivitu. Tento motiv je tedy rozhodující pro stimulaci p53 pomocí MEG3 izoform. V buňkách rakoviny tlustého střeva bylo zjištěno, že každá izoforma MEG3 způsobuje zvýšení aktivity p53 ve srovnání s prázdným vektorem. MEG3a, MEG3f a MEG3h jsou slabými aktivátory, MEG3e a MEG3i silnými aktivátory^{102,106}.

3.3.5 MEG3 a cAMP

Cyklický AMP je známým druhým poslem, může regulovat buněčný cyklus a apoptózu díky aktivaci cAMP-dependentní protein kinázy. Tato aktivace zvyšuje fosforylaci cílových proteinů¹³⁷. Buňky lidských fibroblastů byly ošetřeny cAMP a hladina MEG3 byla významně zvýšena oproti neošetřeným kontrolám.

Exprese MEG3 je stimulována cAMP přes cAMP reaktivní element (CRE) bezprostředně před prvním exonem v oblasti promotoru MEG3¹³⁸. Naopak promotorová hypermetylace blokuje vazbu CRE a rodiny CRE proteinů (CREB), a blokuje iniciaci transkripce MEG3 (viz. obr. 8)^{102,139}.



Obr. 8: Ovlivnění transkripce MEG3 pomocí cAMP nebo hypermetylace.

Při stimulaci pomocí cAMP a CRE dochází k transkripci genu MEG3. Naopak hypermetylace promotoru blokuje vazbu CRE, proteinů CREB a blokuje transkripci.

3.3.6 MEG3 a angiogeneze

Byly porovnávány genové expresní profily v mozcích embryonálních MEG3 KO a wild-type myši. Mezi geny, které byly deregulovány u MEG3 KO myši, se nachází geny pro angiogenezi.

Potvrdila se změna exprese vaskulárního endoteliálního růstového faktoru alfa (VEGFA) a jeho receptoru (VEGFR1). Tato exprese je zvýšena v mozku MEG3 KO myší oproti expresi u wild-type myší. Receptor VEGFR1 a VEGFA jsou primárními regulátory angiogeneze. Delece genu MEG3 a jeho inaktivace vede k podpoře angiogeneze a přispívá k vývoji nádoru^{102,140,141}.

4 Experimentální část

Hlavním cílem experimentální části bylo zachycení transkriptu genu MEG3 v tkáňových řezech pomocí RNA in situ hybridizace a analýza míry exprese a lokalizace MEG3.

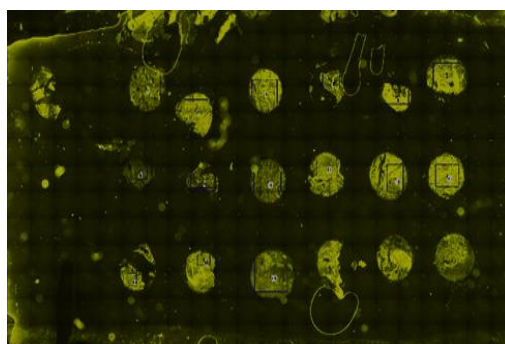
V první fázi experimentu byly vytvořeny čerstvé řezy pomocí mikrotomu a následně byla provedena RNA in situ hybridizace připravených řezů.

Během druhé fáze byla provedena analýza míry exprese a lokalizace MEG3 v jednotlivých vzorcích pomocí obrazové analýzy získaných snímků z fluorescenční mikroskopie. Tato data byla korelována s potenciální prognózou pacientů primárně z hlediska rekurence a WHO gradu.

4.1 Biologický materiál

Jako výchozí materiál byly použity tkáňové microarraye (TMA), které byly připraveny makrodisekcí chirurgicky odstraněných meningiomů ve Fakultní Nemocnici Olomouc, fixovaných a uchovaných v parafínu (FFPE) ve tmě a při pokojové teplotě.

Každá array (obr. 9) se skládala z 24 „terčů“ představující makrodisektáty z původních FFPE bloků. Na TMA se vždy vyskytovaly dvě kontrolní tkáně v páru (vždy čtyři kontroly na jedné TMA), konkrétně se jednalo o plíce, srdce a pankreas. Kontrolní tkáně byly získány z archivu Fakultní nemocnice v Olomouci, které byly odebrány od pacientů netrpících nádorovým onemocněním daného orgánu. Zbýlých dvacet terčů bylo deset párových vzorků meningiomů (od každého pacienta vždy dva vzorky z jednoho nádoru), kterým byl meningiom chirurgicky odstraněn.



Obr. 9: Jednotlivé tkáňové microarray chirurgicky odstraněných meningiomů a řez tkáňové microarray pod mikroskopem. Použití fluorescenčního mikroskopu, zvětšení 20x, použití vzduchové vrstvy mezi objektivem a krycím sklem.

4.2 Použité přístroje a chemikálie

Pro experimentální metody byl použit komerční kit ViewRNA ISH Tissue 1-Plex Assay Kit a ViewRNA™ Chromogenic Signal Amplification Kit (1-plex) v kombinaci se specifickou sondou ViewRNA Tissue Probe Set – MEG3 (Thermo Fisher Scientific). K fluorescenčnímu podbarvení jader bylo použito DAPI (4',6'-diamidino-2-fenylindol), dodávaný firmou Thermo Fisher Scientific a hematoxylin (Sigma). Pro montování sklíček bylo použito Histomount Mounting Solution (Thermo Fisher Scientific). Z běžně dostupných chemikálií, které nebyly součástí komerční soupravy, byl použit xylen, 96% ethanol, 37% formaldehyd, zásobní roztok 10x fosfátový pufr (PBS) a ddH₂O.

Seznam použitých přístrojů, které byly použity během experimentálních metod je uveden v tab. 1.

Přístroj	Model	Výrobce
Vodní lázeň	Julabo TW8	Sigma-Aldrich
Hybridizační plocha	DB-2D	Techne
Minicentrifuga	Minispin	Eppendorf
Termoblot	MyBlock Mini	Benchmark
Vortex	Grant-Bio PV-1	Grant
Laboratorní váha	ED423S-OCE	Sartorius
Mikrotom	Slide 4004 M	PFM Medical
Parafinová vodní lázeň	Sakura	Sakura
Konfokální mikroskop	Axio Observer + spinning disc Yokogawa	Zeiss
Fluorescenční mikroskop	Olympus IX83 + obj. LUCPLFLNPH 40x, Zyla kamera	Olympus
Fluorescenční mikroskop	Olympus BX60	Olympus

Tab. 1: Seznam použitých přístrojů.

4.3 Použité experimentální postupy

Následující níže popsané experimentální postupy byly použity pro všechna finální obrazová data, která byla zahrnuta ve výsledném statistickém zpracování.

4.3.1 Krájení preparátů na mikrotomu

Mikrotomy slouží ke krájení histologického materiálu a následně ke zhotovení preparátů. Pro zhotovení bylo použito sáňkového mikrotomu, který je vhodný pro krájení řezů zalitých

do parafinu. Nosič, na kterém je bloček, byl připevněn do tzv. neapolské svorky. Svorka umožňuje měnit sklon nože ke směru řezu a také sklon k rovině řezu. Nůž (žiletka) je upevněn a veden k rovině proti bloku. Po každém řezu je posouván šroubem do výšky o nastavený počet mikrometrů proti bločku (při experimentech bylo nastaveno 5 μm)¹⁴².

Popis metody:

- Do příslušných držáků byly uchyceny žiletka a FFPE bloček. Kolečkem volby tloušťky řezů byla nastavena požadovaná hodnota (5 μm). Následně bylo provedeno „zkrájení bločku“ pomocí kolečka makroposuvu, které se používá pro rychlé nastavení požadované vzdálenosti mezi bločkem a ostrím nože. Byl proveden řezný pohyb horizontálním posuvem madla držáku nožů. Poté byl nůž vrácen do původní polohy a nakrájený řez byl přenesen jehlou do teplé vodní lázně (56 °C), kde se řezy rozepnou. Rozepnuté řezy byly zachyceny na podložní sklíčko. Čerstvě nakrájené parafinové řezy o tloušťce 5 μm byly zahřáty (parafín byl rozpuštěn) na hybridizační ploše při 60 °C po dobu 90 minut.

4.3.2 Navázání sondy a barvení preparátů

Pro navázání sondy byl použit komerční kit ViewRNA ISH Tissue 1-Plex Assay (obr. 10) a ViewRNA™ Chromogenic Signal Amplification Kit (1-plex) v kombinaci se specifickou sondou ViewRNA Tissue Probe Set – MEG3 (Thermo Fisher Scientific). Jedná se o velmi citlivou RNA in situ hybridizační metodu (RISH) pro rozlišení jednotlivých transkriptů. Nejprve došlo k deparafinizaci a dehydrataci. Pomocí proteázy došlo k natrávení tkáně a následně navázání sondy (generující červený signál), která obsahuje 20 oligonukleotidů komplementárních k transkriptu genu MEG3. Každá tzv. Z sonda se váže na cílový transkript v páru (viz obr. 10) a obsahuje sekvenci bází komplementární k cíli, sekvenci spaceru a koncovou sekvenci, na kterou se váže preamplifier. Amplifiery (zesilovače) byly navázány na vazebná místa každého preamplifieru. Specifické oligonukleotidy, konjugované s alkalickou fosfatázou (Label Probe-AP), se naváží k amplifieru. Po přidání substrátu Fast Red (2), dochází díky alkalické fosfatáze (1) k tvorbě chromogenního signálu v podobě červených teček v místech, kde jsou navázány sondy¹⁴³.

Příprava roztoků:

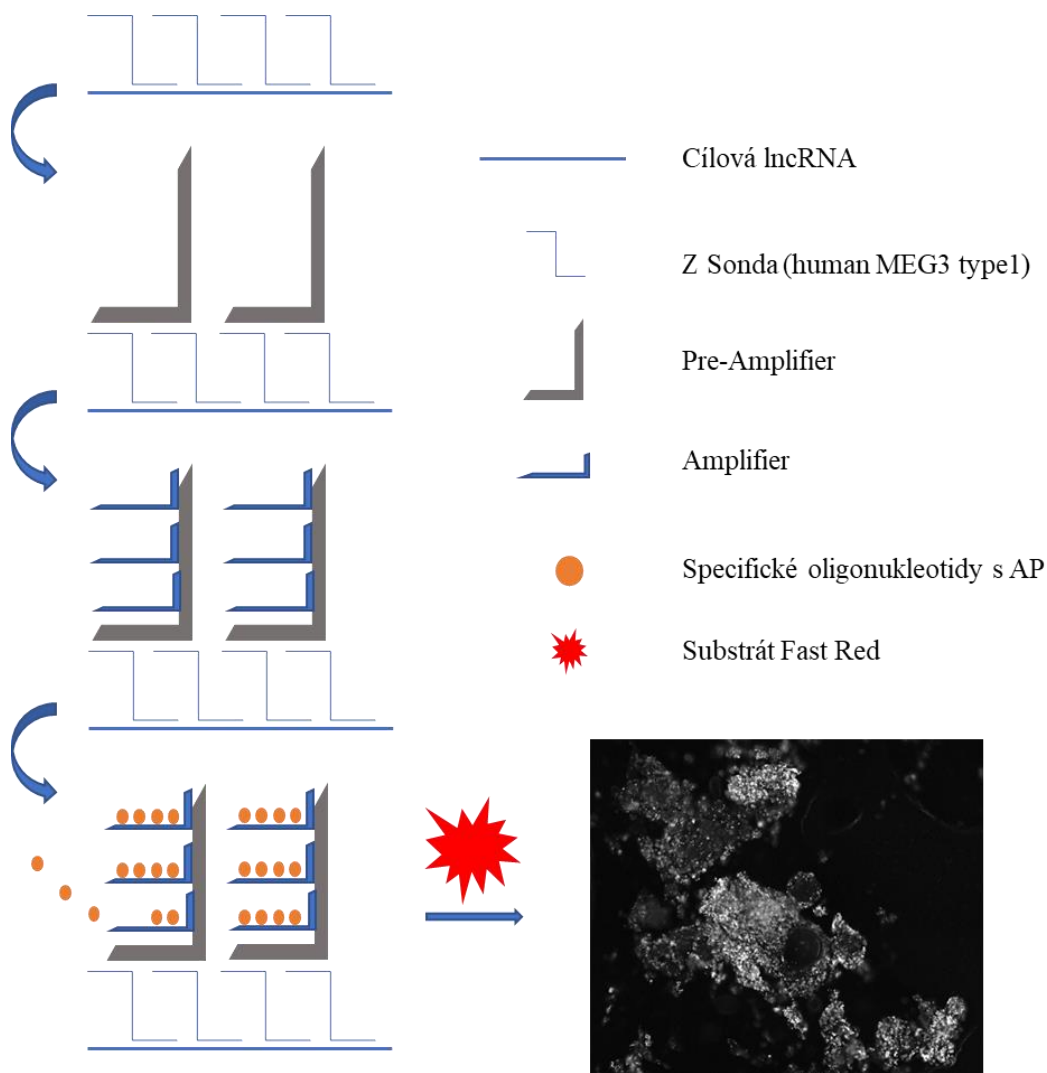
- **1 000 ml 1x PBS** – 100 ml 10x zásobní roztok PBS, 900 ml ddH₂O
- **200 ml 10 % NBF** – 178 ml 1x PBS, 22 ml 37 % formaldehydu
- **1 000 ml Wash Buffer** – 833 ml ddH₂O, 9 ml Wash Comp 1, 2,5 ml Wash Comp 2, nakonec doplněno ddH₂O do 1 000 ml
- **500 ml 1x Pretreatment Solution** – 5 ml 100x Pret. Solution, 495 ml ddH₂O

Popis metody:

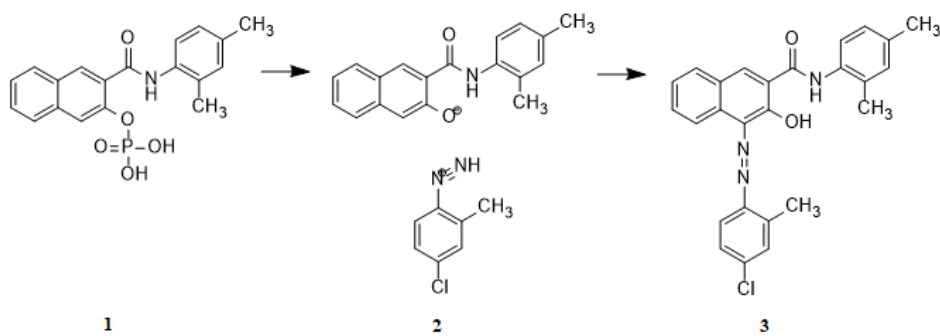
- Nejdříve byla přehřívána vodní lázeň na 90-95 °C a hybridizační plocha na 40 °C. Sklíčko bylo vloženo do Coplinovy nádoby s xylenem a inkubováno 3 x 5 minut. Poté bylo sklíčko inkubováno v Coplinově nádobce s 96% ethanolem 2 x 5 minut. Po vyjmutí bylo sklíčko ponecháno 5 minut na vzduchu, aby proschlo. Pomocí hydrofobního pera byla na sklíčku vytvořena hydrofobní bariéra a ponechána 25 minut uschnout. Sklíčko bylo ponořeno do zkumavky s roztokem 1x Pretreatment Solution, který byl předem připraven. Zkumavka se sklíčkem byla vložena do horké vodní lázně překryté alobalem a ponechána 15 minut v lázni.
- Sklíčko bylo promyto v Coplinově nádobě s ddH₂O 2x vždy po dobu 1 minuty. Poté bylo sklíčko vloženo do nádoby s 1x PBS, mezitím bylo 396 µl 1x PBS přehříváno na 40 °C. K 396 µl 1x PBS bylo přidáno 3,5 µl Proteázy QF. Sklíčko bylo jemně osušeno, vzorky byly převrstveny připraveným proteázovým roztokem a inkubovány při 40 °C 15 minut. Roztok byl odstraněn, sklíčko osušeno a vloženo do nádoby s 1x PBS po dobu 1 minuty. Promytí s 1x PBS bylo znovu zopakováno.
- Sklíčko bylo vloženo do zkumavky s 10 % NBF a inkubováno při pokojové teplotě (RT) 5 minut. Dále bylo sklíčko vloženo do 1x PBS 2 x 1 minutu. Mezitím bylo přehříváno 392 µl Probe Set Diluent QF na 40 °C a k diluentu bylo přidáno 8 µl ViewRNA TYPE 1 Probe Set (HUMAN MEG3 1.1). Ze sklíčka byl odstraněn roztok 1x PBS, sklíčko bylo osušeno, převrstveno připraveným roztokem a inkubováno 3 hodiny při 40 °C.
- Před koncem inkubace byly z lednice vytaženy Fast Red tablety, Naphthol Buffer, AP Enhancer Solution a Amplifier Diluent QF. Amplifier Diluent QF byl přehříván na 40 °C. Po tříhodinové inkubaci se sondou byl roztok odstraněn a sklíčko vloženo do nádoby s Wash Bufferem 3 x 2 minuty. K 396 µl Amplifier Diluent QF bylo přidáno 4 µl Pre Amp 1 QF, sklíčko bylo převrstveno a inkubováno 25 minut při 40 °C. Poté bylo sklíčko promyto Wash Bufferem 3 x 2 minuty. Následně byl 396 µl Amplifier

Diluent QF přehřát na 40 °C a k roztoku bylo přidáno 4 µl Amp 1 QF. Sklíčko bylo roztokem převrstveno a inkubováno 15 minut při 40 °C. Sklíčko bylo promyto Wash Bufferem 3 x 2 minuty. Následně bylo přehřáto 399,6 µl Label Probe Diluent QF na 40 °C a poté k němu bylo přidáno 0,4 µl Label Probe-AP. Po převrstvení tímto roztokem bylo sklíčko inkubováno při 40 °C 15 minut. Sklíčko bylo promyto Wash Bufferem 3 x 3 minuty.

- Sklíčko bylo převrstveno 400 µl AP-Enhancer Solution a inkubováno 5 minut při RT. Mezitím byl připraven barvicí roztok. Na jedno sklíčko bylo potřeba 10,5 mg nadrcené Fast Red Substrate tablety rozpuštěné v 500 µl Naphthol Buffru. Roztok byl uchováván ve tmě. AP-Enhancer Solution byl co nejdůkladněji odstraněn ze sklíčka, sklíčko bylo poté převrstveno 400 µl barvicího roztoku. Roztok byl inkubován na sklíčku při 40 °C po dobu 30 minut.
- Mezitím byl připraven roztok DAPI. 9 mg bylo rozpuštěno v 30 ml ddH₂O. Následně byl roztok zředěn 100x (1 ml DAPI a 99 ml ddH₂O). Sklíčko bylo promyto v 1x PBS po dobu 30 sekund, následně v ddH₂O po stejnou dobu. Nakonec bylo sklíčko vloženo do zředěného roztoku DAPI na 2 minuty. Poté bylo sklíčko promyto 1 minutu v ddH₂O. Sklíčko bylo ponecháno při RT a tmě 20-30 minut, aby se usušilo. Následně bylo sklíčko montováno krycím sklíčkem s naneseným Histomount médiem. Po zaschnutí bylo sklíčko vloženo do krabičky a skladováno v lednici.



Obr. 10: Schéma komerčního protokolu ViewRNA ISH Tissue 1-Plex Assay.



Obr. 11: Reakční schéma substrátu Fast Red a naftol AS-MX fosfátu¹⁴⁴.

Reakční schéma naftol AS – MX fosfátu (1) a substrátu Fast Red (2), kdy po reakci dochází k tvorbě červených teček v místech, kde je navázaná sonda. Naftol AS – MX fosfát demonstruje alkalickou fosfatázu.

4.3.3 Použití fluorescenčního a konfokálního mikroskopu

Konfokální mikroskop se řadí mezi světelné mikroskopy. Zdrojem světla je laser, který prochází přes clonu (štěrbinu) a objektiv osvětluje preparát. Objektivem zpět prochází světlo odražené. Po průchodu dichroickým zrcadlem dochází ve štěrbině k odfiltrování světla z ostatních rovin. V poslední fázi jsou paprsky zesíleny ve fotonásobiči a detekovány. Během detekce získáme informaci jen z jednoho bodu¹⁴⁵. Byl použit mikroskop Axio Observer (Zeiss), objektiv Plan Apochromat, spinning disc Yokogawa.

Detekce signálu konfokálním mikroskopem:

- DAPI – excitace 390 nm a emise 447 (+/- 60) nm
- Fast Red dye – byla vybrána excitace při 570 nm s detekcí emise při 610 nm

Fluorescenční mikroskop používá kratších vlnových délek v UV oblasti a následně emituje viditelné světlo delších vlnových délek. Excitační záření projde excitačním filtrem a dojde k prostupu světla o určité vlnové délce. Následně světlo projde na dichroické zrcadlo, odrazí se, projde přes objektiv na preparát a vede k excitaci elektronů a vyzáření světla v preparátu. Emitované světlo projde přes bariérový filtr, který propustí záření o vlnové délce, která odpovídá použitému fluorochromu¹⁴⁶. Byl použit mikroskop Olympus IX83, objektiv LUCPLFLN PH a kamera Zyla.

Emitované záření fluorescenčního mikroskopu bylo kamerou detekováno:

- DAPI – excitace 390 nm a emise 447 (+/- 60) nm, detekce viditelného modrého světla
- Fast Red dye – pro detekci bylo potřeba použít kanál Cy3/TRITC, excitace 530 (+/- 20) nm, emise 590 (+/- 20) nm, detekce viditelného červeného světla

Popis:

- Z důvodu časové náročnosti a nízké efektivity focení TMA na konfokálním mikroskopu byl nakonec použit plně automatizovaný fluorescenční mikroskop Olympus IX83. Jednotlivé preparáty byly nafoceny v kanále Cy3, na který systém automaticky ostřil a DAPI. Pomocí softwaru cellSens Dimension bylo získáno 20 jednotlivých snímků o velikosti 2048 x 2048 pixelů, které byly následně spojeny do větších obrazových ploch (překrytí jednotlivých snímků bylo 20 %). Z důvodu špatně viditelných červeně zbarvených transkriptů genu MEG3 na modrém poli bylo změněno modré zbarvení jednotlivých jader na zelené. Lidské oko dokáže červenou barvu na zeleném poli lépe identifikovat.

4.3.4 Obrazová analýza

Po nafocení všech preparátů fluorescenčním mikroskopem bylo potřeba vybrat tzv. místa zájmu (ROI), kde byla detekována síla signálu pomocí softwaru cellSens Dimension (Olympus). Jednotlivé výřezy tkání byly přiřazeny k pacientům podle umístění kontrolních tkání na daných TMA.

Popis:

- V každém terčíku bylo ručně vybráno 3-6 ROI ploch k analýze na homogenních místech bez cév a jiných artefaktů. Následně bylo provedeno ruční prahování signálu pro každý obrázek zvlášť. Po prahování byly automaticky spočítány počty signálů a jejich plochy pro jednotlivé velikostní kategorie (1, 15, 30, 60, 100, 250, 500 px), které byly vztaženy na plochu analyzované ROI. Plocha a umístění jader nebyly brány v potaz, pouze napomohly k orientaci ve tkáni a také k výběru vhodných míst pro analýzu.

4.3.5 Použité statistické metody

Cílem bylo identifikovat a spočítat počty signálů jednotlivých velikostních kategorií v ručně vybraných plochách (ROIs). Studentův t-test a Wilcoxonův test byly použity pro porovnání podílů bodů jednotlivých velikostních kategorií vzhledem k rekurenci, WHO gradu a pořadí nádoru (primárním/sekundárním). Dále byla pomocí Wilcoxonova testu hodnocena rekurence/WHO grade v závislosti na procentu svítící plochy a míře odlišnosti jednotlivých ROI ve vzorku od průměru. Pomocí ANOVA testu byly porovnány podíly bodů vzhledem k nerekurentním, primárním/sekundárním rekurentním nádorům. Pearsonův test byl použit pro porovnání jednotlivých WHO gradů a rekurence (ano/ne). Fisherův test byl použit pro porovnání nerekurentních nádorů a primárních/sekundárních rekurentních nádorů vzhledem k WHO gradu.

4.4 Popis pacientů

Soubor obsahoval 302 pacientů, kteří podstoupili v letech 1990-2012 operaci meningiomu, a kterým byl odebrán dostatek tkáně pro další výzkum. Všichni pacienti podepsali informovaný souhlas a byla získána komplexní klinická data. Zobrazovací a klinické sledování se provádělo ve třech a dvanácti měsících od operace. U pacientů, přibližně 24-72 měsíců od operace, nedošlo k žádné recidivě nebo opětovnému růstu. Pokud došlo u pacientů k recidivě

nebo opětovnému nárůstu meningiomu, byla naplánována další klinická sledování. Rekurence po totální (Simpson grade I, II, III) nebo částečné (Simpson grade >III) resekci nádoru byla definována jako znovuobjevení jakékoli nové léze v místě, kde byl meningiom odstraněn nebo jako růst pozůstatků nádoru po primárním chirurgickém zákroku. Pokud během sledování pacientů došlo u některého z nich k významnému růstu nádoru, pacient byl reoperován nebo podstoupil radiační terapii.

Tab. 2 a 3 ukazuje reálný počet pacientů, kteří byli vybráni pro tento výzkum. Tab. 2 ukazuje zastoupení meningiomů rekurentních a nerekurentních u žen. Je zde zjevný vyšší počet meningiomů WHO gradu I. Z uvedených dat je zjevný relativně nízký věk při diagnóze v použitém souboru. U průměrného věku jsou v závorkách uvedeny odlehle hodnoty, které při výpočtu průměru nebyly započteny. Tab. 3 ukazuje výskyt meningiomů u mužů. Opět jsou stejným způsobem uvedeny zastoupení WHO gradů a průměrný věk. Průměrný věk celé skupiny činí 53,9 let.

ženy	počet	grade I	grade II	grade III
rekurentní	34	19	8	7
nerekurentní	53	44	7	2
průměrný věk	-	54,1 (21,2x31,32,33,3x34)	61,8 (30,33,34)	57,1 (31,32,99)

Tab. 2: Zastoupení žen v souboru.

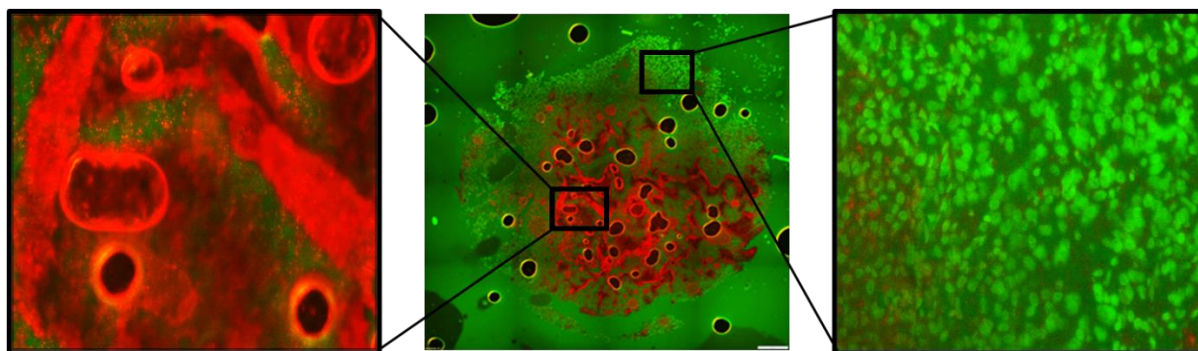
muži	počet	grade I	grade II	grade III
rekurentní	21	9	9	3
nerekurentní	15	7	7	1
průměrný věk	-	51,4 (17,28)	45,8 (28)	53

Tab. 3: Zastoupení mužů v souboru.

5 Výsledky

5.1 Optimalizace přípravy preparátů

K dispozici byly předpřipravené starší řezy, které byly bohužel nevyhovující. Hlavním důvodem pro tvorbu nových řezů byla jejich tloušťka. Starší řezy byly tlustší než 5 μm . Při montování sklíčka Histomount médiem docházelo k tvorbě bublin a správné snímání preparátů nebylo možné (obr. 12). Díky nevhodné tloušťce řezů se při snímání vyskytovaly další artefakty vedoucí k nedostatečnému rozlišení jednotlivých signálů a celkového obrazu snímku vlivem opticky nepřístupného prostředí.



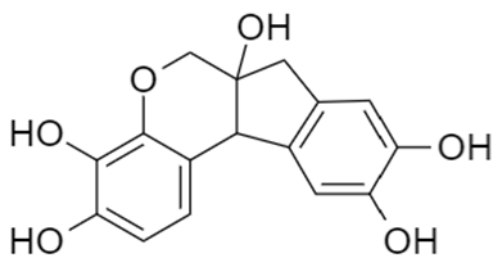
Obr. 12: Nevyhovující tkáňový řez. Červené tečky označují transkripty genu *MEG3*, jádra jsou zde zobrazena zeleně. Filtry pro DAPI a Cy3, zvětšení 40x, použití vzduchové vrstvy mezi objektivem a krycím sklem.

Na obrázku lze vidět původní preparát staršího data, který byl snímán pomocí fluorescenčního mikroskopu. Detekci signálu znemožňovala přítomnost artefaktů způsobených nevhodnou tloušťkou řezů. To vedlo k rozhodnutí vytvořit řezy o tloušťce 5 μm .

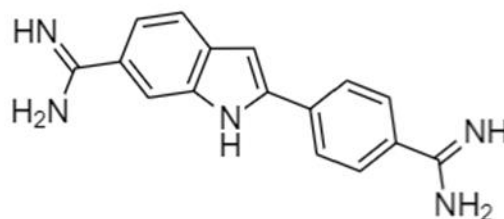
Z více než třiceti TMA bločků bylo vybráno osmnáct bločků, kde bylo jasně viditelných všech 24 terčků makrodisekovaných tkání. Z každého TMA bločku byly připraveny minimálně tři řezy. Parafín na sklíčku byl roztaven pomocí hybridizační plochy při 60 $^{\circ}\text{C}$ na 90 minut. Po vychladnutí takto připravených preparátů bylo vybráno od každého bločku vždy sklíčko s nejvyšším počtem přenesených terčků. Následovalo navázání sondy a barvení preparátů po šesti. Vzhledem k tomu, že šest sklíček bylo velmi náročných na celkovou organizaci a dodržení jednotlivých inkubací (viz podkapitola 6.3.2 výše), pro další experimenty byly výsledné preparáty připravovány pouze po dvou. Díky tomu docházelo k rychlejšímu nanášení jednotlivých roztoků, dodržení jednotlivých inkubačních časů a snazší manipulaci.

Dále byla optimalizována metoda barvení jader pro lepší orientaci ve tkáni. Byly použity dvě metody (obr. 13):

- hematoxylin (zakápnutí, promytí 3 x 1 min kohoutkovou vodou)
- DAPI (4',6'-diamidino-fenylindol)



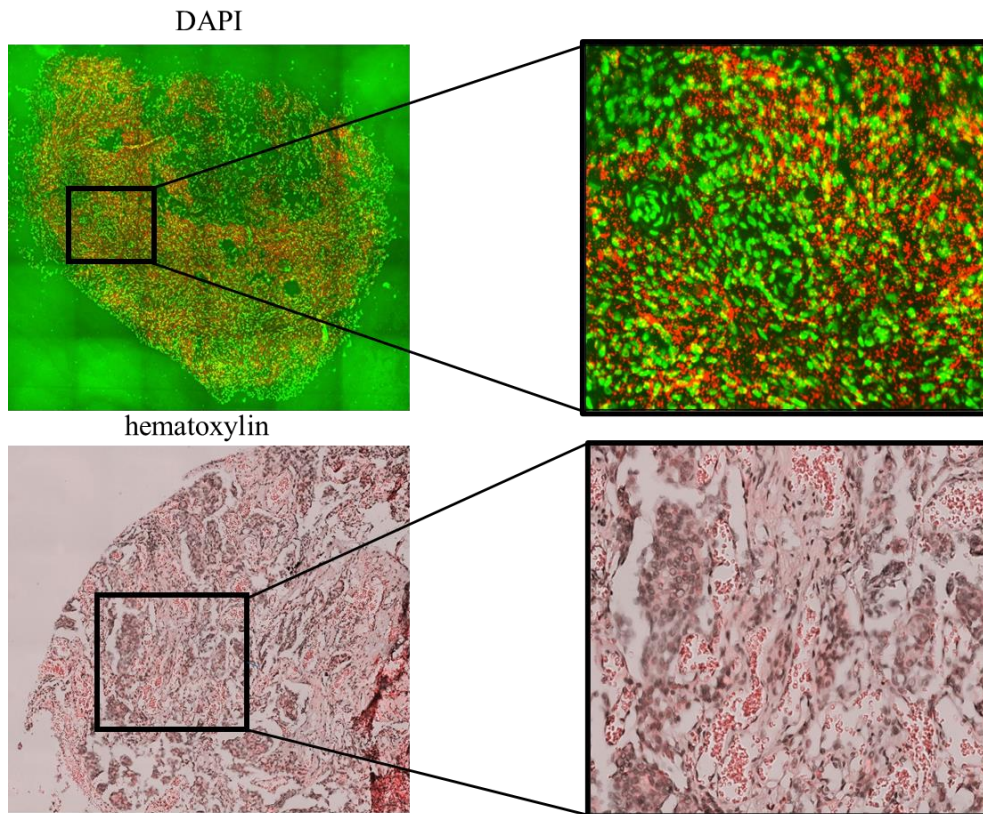
hematoxylin



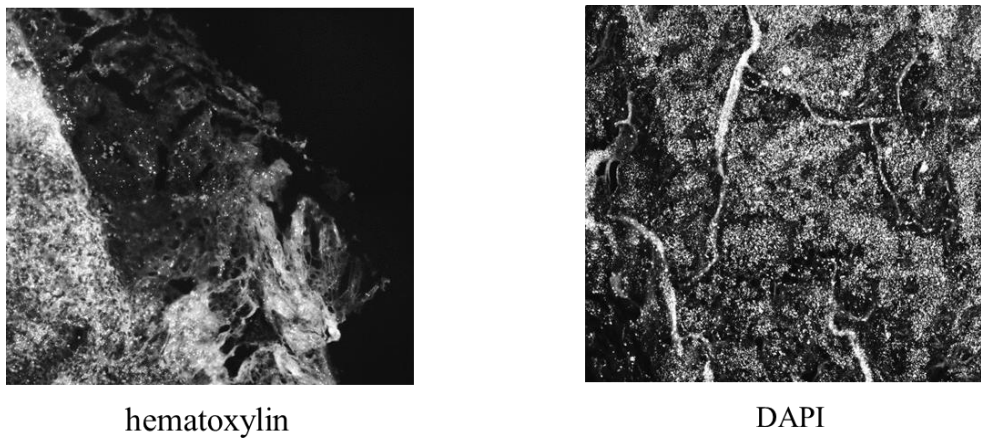
DAPI

Obr. 13: Vzorce sloučenin hematoxylinu a DAPI.

Hematoxylin se běžně používá pro orientaci ve tkáni při histopatologickém hodnocení preparátů. Během barvení byly preparáty zakápnuty komerčním roztokem hematoxylinu a následně promyty 3 x 1 min kohoutkovou vodou. U vzorků, kde bylo použito DAPI byla sklíčka inkubována 2 minuty v roztoku DAPI o koncentraci 3 $\mu\text{g/ml}$ a následně 1 minutu v ddH₂O. Pomocí hematoxylinu dochází ke zbarvení jader, avšak jednotlivé transkripty jsou velmi špatně viditelné (obr. 14). Transkripty MEG3 vytvářely slabé signály a špatně rozlišitelné shluky místo jasně viditelných „teček“ (obr. 15). Během barvení pomocí DAPI, dochází vlivem emise (okolo 500 nm) v mikroskopu k modrému zbarvení jader, ve kterých jsou červené signály (emise okolo 610 nm) transkriptů genu MEG3 dobře rozlišitelné. Pro ještě lepší orientaci ve tkáni došlo pomocí softwaru ke změně modře zbarvených jader na zelenou (viz. níže v popisu focení sklíčka). Jádra jsou tak lépe čitelná a jednotlivé červeně označené transkripty genu MEG3 jsou lépe viditelné. Hematoxylin rovněž zvyšoval autofluorescenci pozorovanou v kanále Cy3 (Obr. 15), což byl jeden z hlavních důvodů špatného rozlišení sledovaných signálů.



Obr. 14: Srovnání použití DAPI a hematoxylinu ve tkáni. Filtry pro DAPI a Cy3 a bright-field, zvětšení 40x, použití vzduchové vrstvy mezi objektivem a krycím sklem.



Obr. 15: Srovnání detekce jednotlivých transkriptů genu MEG3 pomocí snímání pouze v kanálu Cy3 za stejných podmínek jako na obrázku 13.

V kanále Cy3 bylo při použití hematoxylinu velmi těžké rozlišit jednotlivé transkripty genu MEG3, které se vyskytují i v jádrech buněk (slabý signál). Při použití DAPI byly jednotlivé transkripty jasně viditelné ve formě „teček“ a jednotlivé signály bylo možné dobře rozlišit.

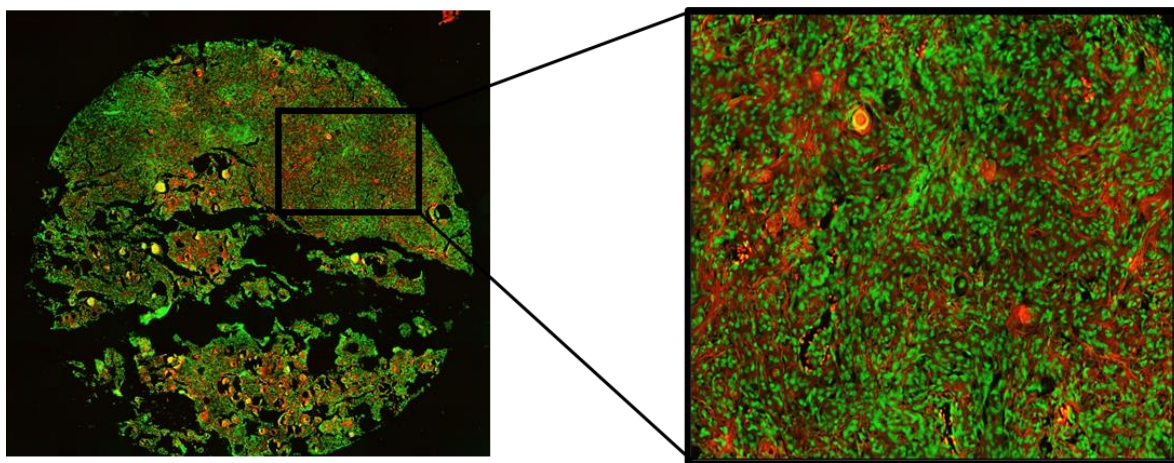
Po výběru typu barvení jader bylo následně vybíráno ze dvou metod dehydratace tkáně:

- při pokojové teplotě (20-30 minut)
- aceton/xylen (vždy 1 minutu v acetonu, acetonu/xylenu 1:1, xylenu)

Dehydratace se po RNA in situ hybridizaci provedla buď klasickým sušením v digestoři, kde sklíčka byla přikryta alobalem nebo pomocí směsi acetonu a xylenu. Preparáty byly v tomto případě ponechány ve třech po sobě jdoucích roztocích po dobu 1 minuty:

- roztok samotného acetonu
- roztok aceton/xylen v poměru 1:1
- roztok samotného xylenu

Roztok aceton/xylen se využívá častěji pro jeho efektivitu. V tomto případě však byl nevyhovující a použité roztoky vymývaly i sondu nebo fluorescenční značku (obr. 16). Proto bylo použito v následujících experimentech metody sušení při pokojové teplotě. Sušení se vždy provádělo v digestoři a preparáty byly zakryty alobalem, aby vlivem světla nedošlo k fototoxickému efektu, a tedy vysvícení sondy.



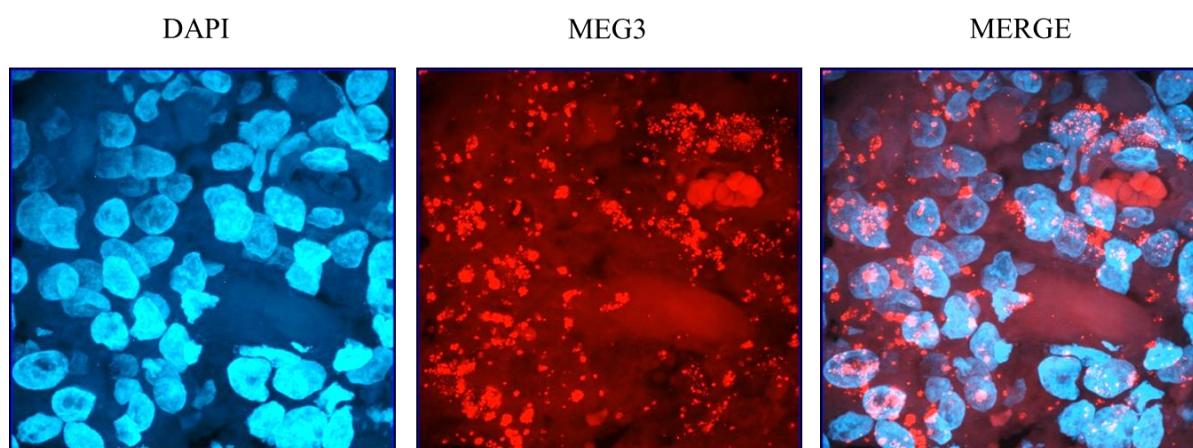
DAPI

Obr. 16: Tkáň po dehydrataci pomocí série roztoků aceton/xylen. Zvětšení 40x, filtry pro DAPI a Cy3.

Na obrázku lze nejasně vidět jednolitě červeně zbarvené shluky, mezi nimiž se vyskytují jednotlivé transkripty genu MEG3.

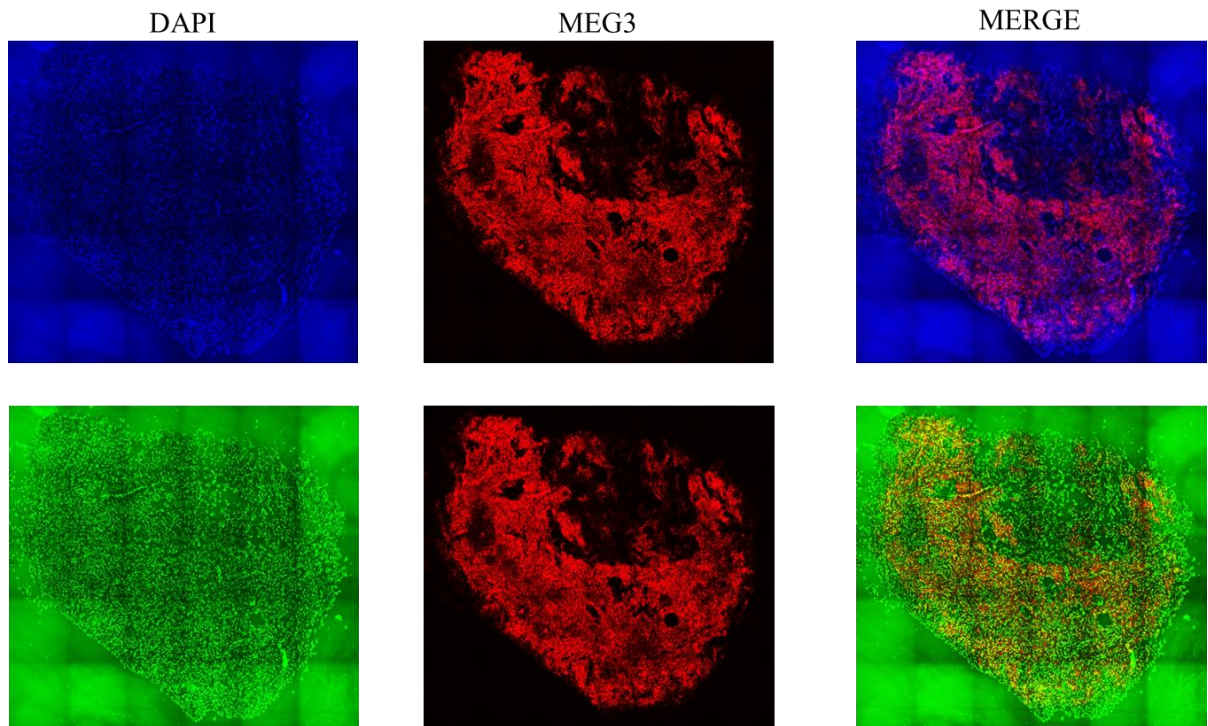
Posledním úkonem celého optimalizačního procesu bylo focení jednotlivých preparátů.

V prvních pokusech byl použit konfokální mikroskop (popis viz 6.3.3 výše). Pro výzkum byl potřeba snímek celé tkáně a u konfokálního mikroskopu lze ručně nastavit pouze jeden bod (obr. 17). Proto byl použit automatický fluorescenční mikroskop z důvodu detekce jednotlivých ploch, které se následně spojily do jednoho snímku celého dostupného makrodisektátu (obr. 18). U automatického fluorescenčního mikroskopu je důležité nastavit jednotlivé parametry detekce, a to filtry pro detekci DAPI a Fast Red, zaostření roviny sklička pro rozhraní sklo/vzduch a výběr jednotlivých ploch pro tvorbu konečného celkového snímku. Celkové snímání jednotlivých terčků bylo důležité pro následnou obrazovou analýzu a statistické zpracování. Důležitý byl správný výběr co nejlépe vypadající tkáně, která obsahovala jasně červené „tečky“ (označené transkripty genu MEG3, které představují jednotlivé signály), jasnou detekci jader a místo detekce bez dalších artefaktů (například cévy, rovnoměrné shluky jader nebo krypty).



Obr. 17: Použití konfokálního mikroskopu pro detekci MEG3 při zvětšení 63x. Použití imerzního oleje mezi objektivem a krycím sklem.

Na kompozitním kanálu pro DAPI jsou viditelná modře zbarvená jádra. Pro MEG3 lze vidět červeně zbarvené transkripty genu MEG3 ve shlucích i jednotlivě. Snímky jsou produktem metody zvané maximum intensity projection, kdy výsledný obraz vzniká složením z více vrstev jedné plochy, tedy z více snímků snímaných při pohybu objektivu v rámci osy z.

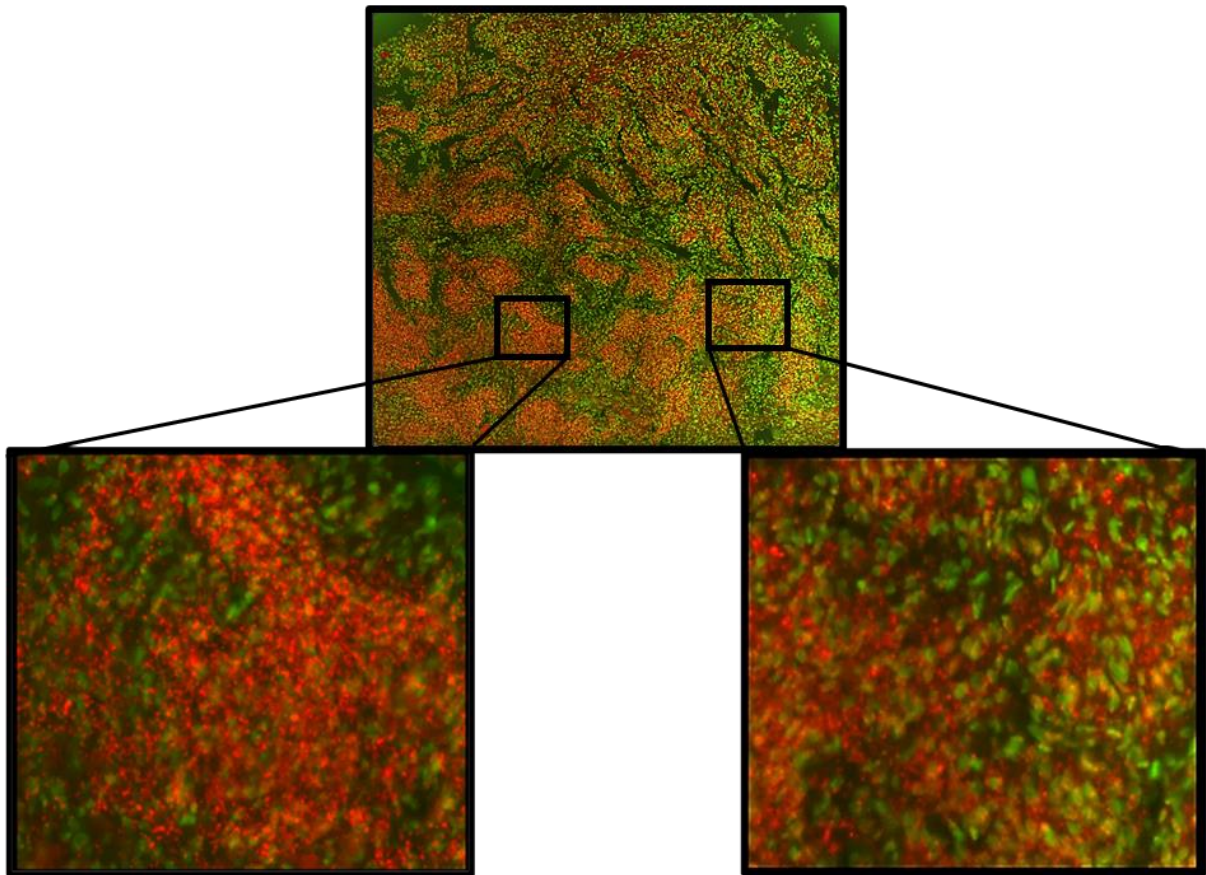


Obr. 18: Použití fluorescenčního mikroskopu pro focení jednotlivých TMA. Filtry pro DAPI a Cy3. Zvětšení 40x, pouze vzduchová vrstva mezi objektivem a krycím sklem.

V horním řádku pro detekci DAPI jsou velmi špatně viditelná jednotlivá jádra. Proto bylo pomocí softwaru zvoleno zelené zbarvení jader (dolní řádek), aby jednotlivé transkripty genu MEG3 byly lépe na pozadí rozlišitelné. Výsledné obrazce složeny z jednotlivých ploch celého postupně snímaného terčíku (viditelná mřížka).

Finální protokol (obr. 19), který byl použit u všech 123 pacientů, měl následující náležitosti:

- tloušťka řezu 5 μm
- použití DAPI, dehydratace na vzduchu 20-30 minut
- snímání pomocí plně automatizovaného fluorescenčního mikroskopu
- použití softwaru cellSens Dimension pro změnu zbarvení jednotlivých jader

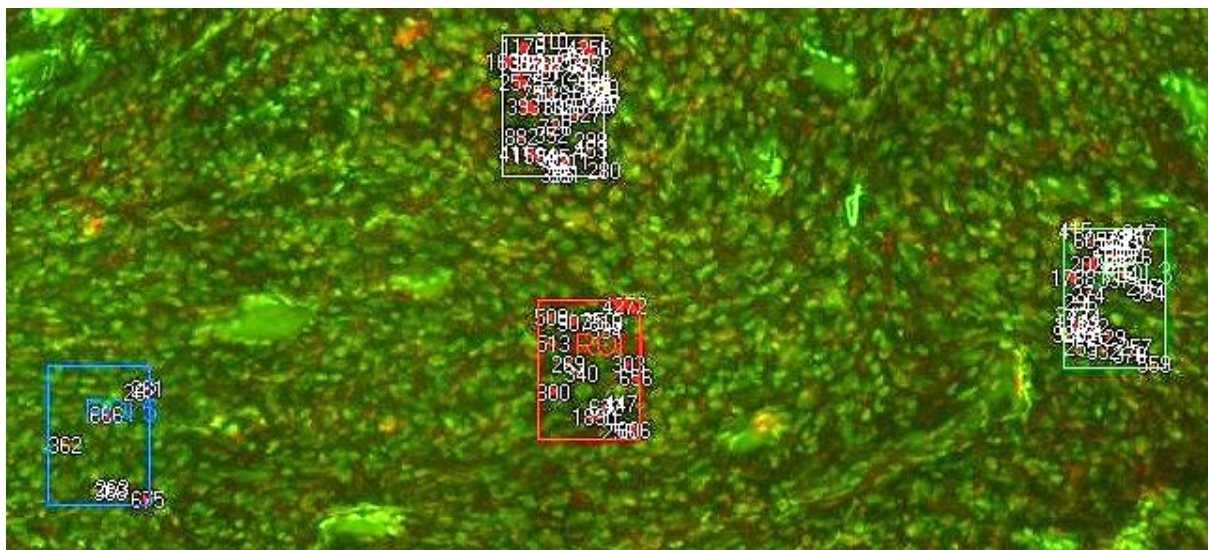


Obr. 19: Snímek finálního preparátu po optimalizaci protokolu a jeho vybraná zvětšená místa. Filtry pro DAPI a Cy3, zvětšení 40x, vzduchová vrstva mezi objektivem a krycím sklem.

Na finálním preparátu jsou detekovány jasné viditelné červené „tečky“, které představují signál jednotlivých transkriptů genu MEG3. Na obrazcích níže jsou zvětšená dvě vybraná místa, která dokazují přítomnost jednotlivých transkriptů genu a viditelných jader v preparátu.

5.2 Statistické hodnocení

Následně byla provedena obrazová analýza jednotlivých „terčíků“ pomocí softwaru cellSens Dimension (obr. 20). V místě terčíku bylo ručně vybráno 3-6 tzv. míst zájmu, (ROI), kde byly automaticky spočítány počty signálů pro vybrané velikostní kategorie ve vztahu k ploše dané ROI (viz tab. 4).



Obr. 20: Ručně vybraná místa detekce signálu na terčíku 4_1m5, sklo 7A pomocí softwaru cellSens Dimension.

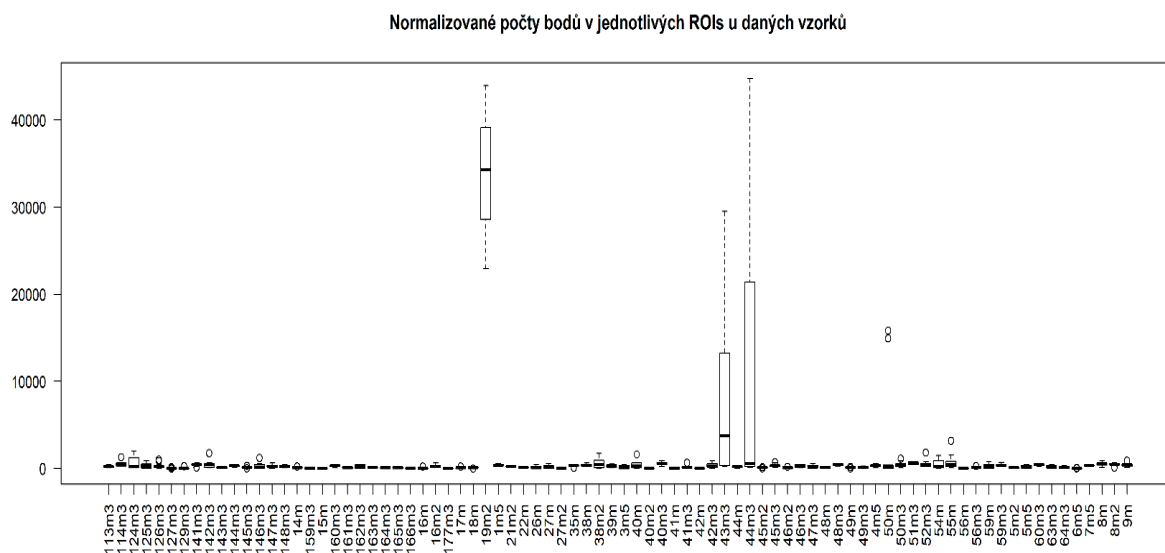
250 px	ROI Area[pixel ²]	Počet signálů
ROI 1	399645	17
ROI 2	399645	9
ROI 3	399645	31
ROI 4	399645	37
ROI 5	399645	7

Tab. 4: Příklad získaných hrubých dat pomocí softwaru cellSens Dimension pro vzorek 4_1m5, sklo 7A a velikostní kategorii zaznamenávaných signálů nad 250 px.

U 123 pacientů, u kterých byl proveden finální protokol, byla provedena obrazová analýza. Bylo hodnoceno 82 vzorků, kde byly detekovány signály jednotlivých transkriptů genu MEG3 a jejich lokalizace ve shlucích. U zbylých 41 pacientů nebyl detekován žádný nebo špatně hodnotitelný signál, kde nebylo možné analyzovat počty bodů. U vyšších velikostních kategorií dochází tvorbě klastrů transkriptů genu MEG3. U transkriptů byl hodnocen prognostický význam (míra exprese a lokalizace).

Pro statistické zpracování podílu počtu bodů byly hodnoceny u každé ROI počty bodů velikostních kategorií na celkovém počtu svítících bodů. V tomto případě nebylo potřeba zohledňovat velikost ROIs. Pro každý vzorek pak z podílů jednotlivých ROIs pro každý vzorek byly vytvořeny průměry.

Pro souhrnnou charakteristiku počtu bodů ve vzorcích byl zohledněn počet i velikost jednotlivých ROIs ve vzorku. Byla tedy ze všech ROIs vypočítána referenční velikost celkové plochy (medián 400 440 pixel²). Na tuto velikost byly přepočteny počty bodů pro jednotlivé ROIs. Z přepočtených hodnot byl pro jednotlivé vzorky vytvořen průměr z příslušných ROIs (normalizované počty bodů). Tento průměr byl vytvořen pro hodnotu BODY. Poté byly statisticky vyhodnoceny normalizované počty bodů v jednotlivých ROIs u daných vzorků (obr. 21). U vzorků 19m2, 43m3, 44m3 a 50m byly počty bodů nad 1 000, avšak nebyla mezi nimi nalezena žádná spojitost.



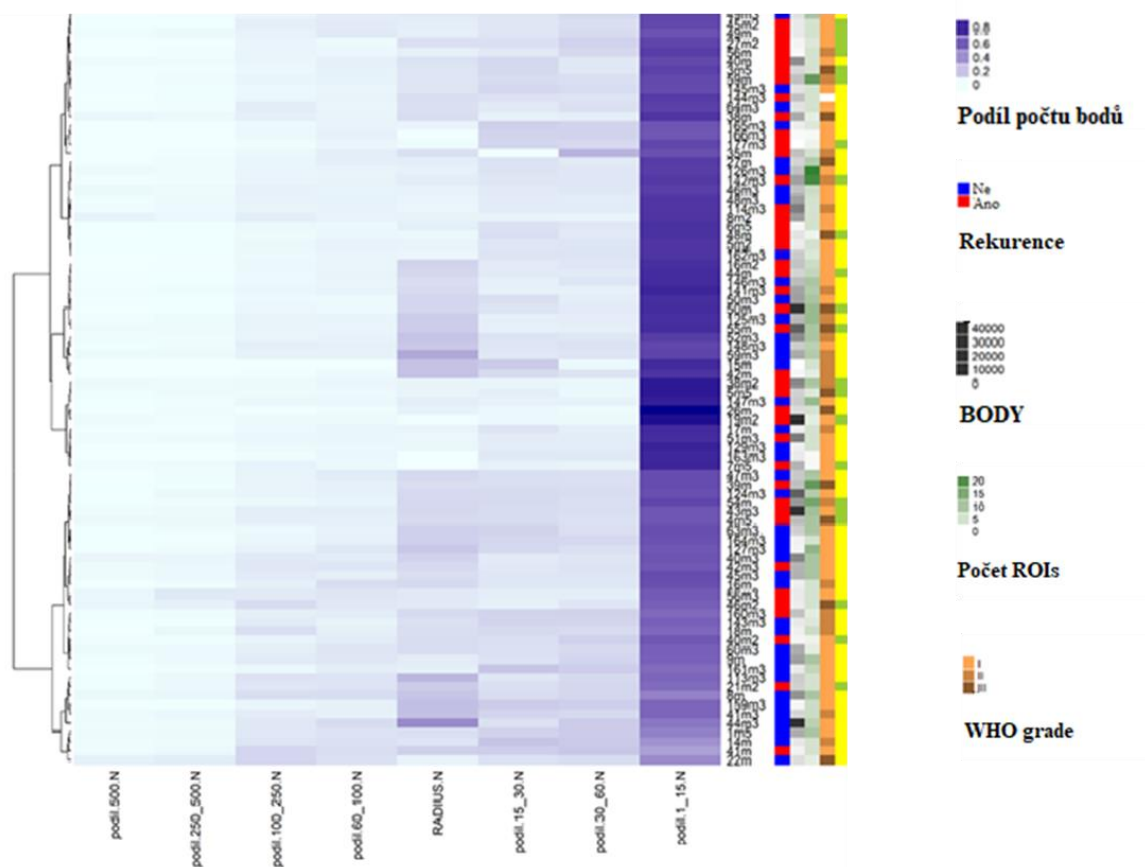
Obr. 21: Normalizované počty bodů v jednotlivých ROIs u daných vzorků.

Ze všech ROIs byla vypočítána referenční velikost celkové plochy, na kterou byly přepočteny body pro jednotlivé ROIs. Následně byl pro jednotlivé vzorky vytvořen průměr z příslušných ROIs (BODY).

Pro další hodnocení byly vybrány vzorky se snímky obsahující alespoň 3 ROIs (odebrány vzorky pod 5% kvantilem). Tyto podmínky splňuje 73 vzorků.

Pro 73 analyzovaných vzorků byla vytvořena heat mapa (obr. 22 na druhé straně) zobrazující na ose x hierarchické klastrování podle podílu počtu bodů na celkovém počtu svítících bodů

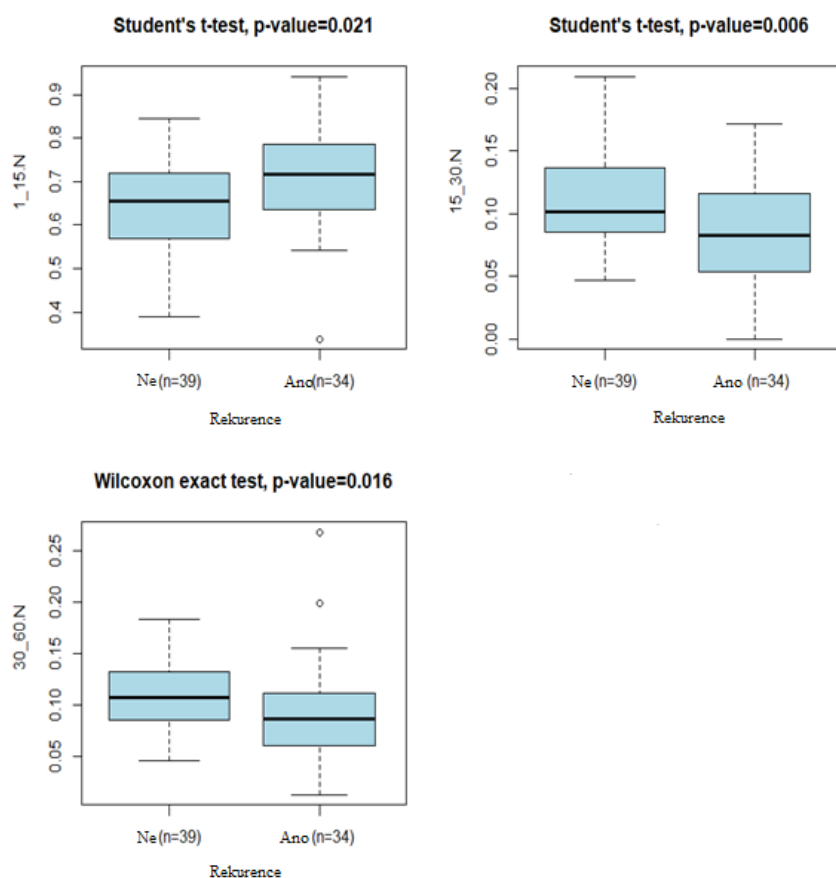
o velikostním rozmezí 1 až 15 px, 15 až 30 px, 30 až 60 px, 60 až 100 px, 100 až 250 px, 250 až 500 px, více než 500 px a RADIUS.N, tedy vzdálenosti hodnot jednotlivých ROIs od průměru mimo 80% kvartil. Podíly počtu bodů byly hierarchicky klastrovány s jednotlivými vzorky. Sytost modrého zbarvení každého pole určuje počet bodů jednotlivých velikostních rozmezí na celkovém počtu svítících bodů ve vzorku. V nejvyšší míře se ve vzorcích nachází body ve velikostním rozmezí 1 až 15 px, tedy jednotlivé rozptýlené transkripty netvořící shluky. Naopak signály o velikosti nad 250 px se objevují jen ojediněle. Ke sdružování vzorků na základě zkoumaných parametrů nedocházelo v závislosti na korelovaných klinických faktorech, tedy rekurenci, WHO gradu nebo pořadí operovaného nádoru (primární nebo sekundární).



Obr. 22: Heat mapa podílu počtu bodů pro jednotlivé velikostní kategorie a RADIUS.N.

Každý řádek heat mapy odpovídá jednomu vzorku, kde byly detekovány jednotlivé body ve velikostních kategoriích. Každý sloupec odpovídá podílu počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií na celkovém počtu ve vzorku. WHO grade, BODY, první/následný nádor a rekurence jsou vyznačeny barevně na pravém okraji heat mapy. Na obou osách je zobrazen výsledný dendrogram funkce hierarchického klastrování.

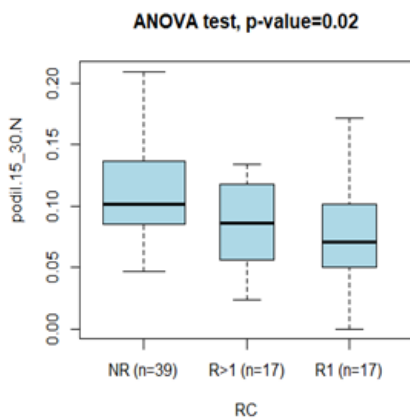
Dále byly porovnány hodnoty podílu počtu bodů všech velikostních kategorií vzhledem k rekurenci – ano/ne (obr. 23). Dále byly porovnány hodnoty RADIUS.N a BODY, tedy rozdíly v heterogenitě v rámci vzorku a míře exprese vzhledem k rekurenci. Signifikantní výsledky byly pozorovány pouze u podílu počtu bodů vzhledem k rekurenci na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Vyšší zastoupení počtu bodů o velikostním rozmezí 1 až 15 px ($p = 0,021$) je u rekurentních pacientů. Dále objekty o velikostním rozmezí 15 až 30 px ($p = 0,006$) a 30 až 60 px ($p = 0,016$) se u rekurentních pacientů nachází ve tkáni v nižší míře, jak je rovněž kvantifikováno na obr. 23.



Obr. 23: Parametry vykazující signifikantní rozdíly mezi rekurentními a nerekurujícími pacienty, konkrétně podíly velikostních skupin bodů v rozsahu 1 až 60 px.

Krabicové diagramy znázorňují podíly počtu svítících bodů ve vzorku v závislosti na rekurenci. Krabicový diagram znázorňuje 1. a 3. kvartil, linie vycházející ze střední části diagramu znázorňují minimální a maximální hodnoty pro tento výpočet a horizontální linie udává medián. V krabicových diagramech jsou kvantifikovány signifikantní rozdíly na hladině významnosti $p \leq 0,05$ u rekurentních pacientů.

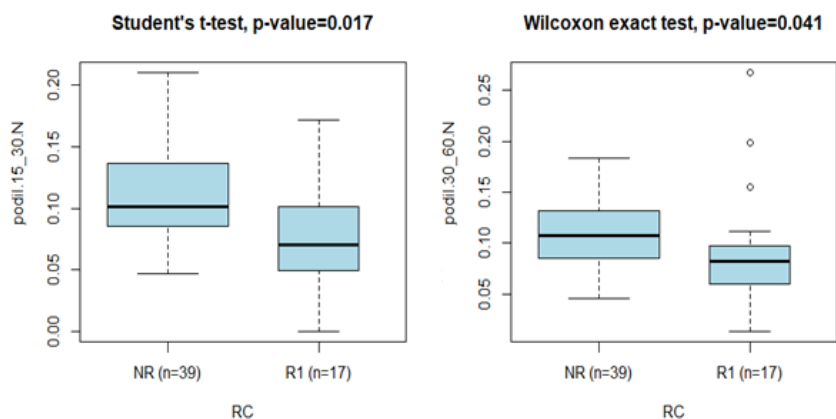
Následně byly porovnány vzorky v podílu počtu bodů v závislosti na třech proměnných (obr. 24 níže). V této analýze byl zohledněn i původ vzorků rekurentních pacientů, tedy jestli analyzovaná tkáň pocházela z primárního prvního vyoperovaného nádoru nebo z následného, rekurencí vzniklého nádoru. Vzorky tedy byly rozděleny na nerekurentní nádory (NR), primární rekurentní nádory (R1) a sekundární rekurentní nádory (R>1). Signifikantní rozdíly vykazovala velikostní kategorie 15 až 30 px ($p = 0,02$) s nejvyšším podílem ve skupině NR, a naopak z hlediska mediánu nejnižším ve skupině R1.



Obr. 24: Parametry vykazující signifikantní rozdíly mezi nerekurentními nádory (NR), rekurentními primárními nádory (R1) a sekundárními rekurentními nádory (R>1), konkrétně podíly svítících bodů velikostního rozmezí 15 až 30 px.

Krabicové diagramy znázorňují počet svítících bodů velikostního rozmezí 15 až 30 px ve vzorku v závislosti na třech proměnných. Krabicový diagram znázorňuje 1. a 3. kvartil, linie vycházející ze střední části diagramu znázorňují minimální a maximální hodnoty a horizontální linie udává medián hodnot. V krabicových diagramech je nejvyšší podíl bodů velikostní kategorie 15 až 30 px u nerekurentních nádorů, naopak nejnižší ve skupině R1.

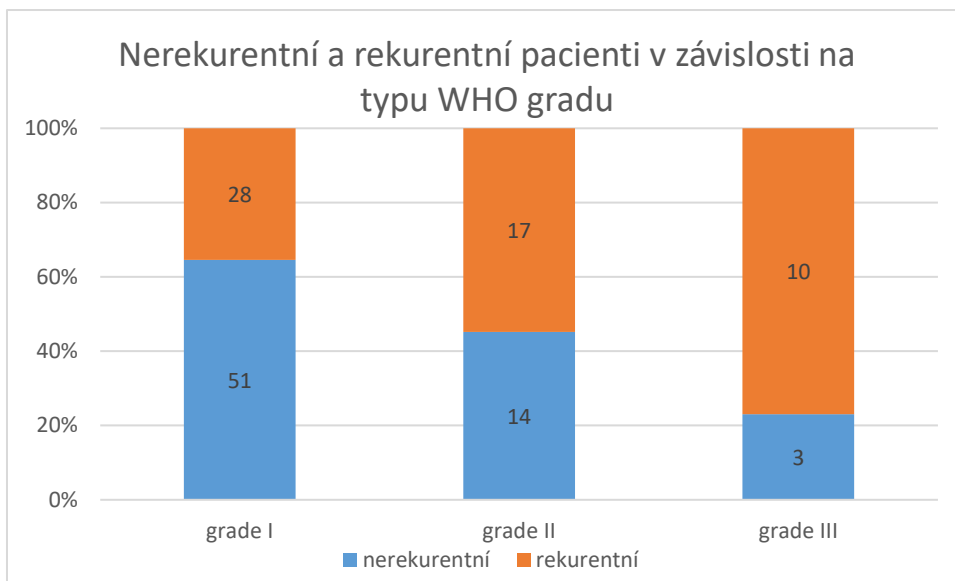
Poté byla vybrána skupina 56 vzorků pro hodnocení (obr. 25) nerekurentních nádorů (NR) a primárních rekurentních nádorů (R1). Proměnné byly opět hodnoceny v závislosti na podílu počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií, celkovému normovanému počtu bodů (BODY) a parametru RADIUS.N vyjadřující heterogenitu mezi ROIs v rámci jednoho vzorku. Signifikantní výsledky byly zjištěny u bodů o velikostním rozmezí 15 až 30 px ($p = 0,017$) a 30 až 60 px ($p = 0,041$). U rekurentních primárních nádorů (R1) dochází ke snížení počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií (15 až 30 px a 30 až 60 px) oproti nerekurentním nádorům (NR).



Obr. 25: Parametry vykazující signifikantní rozdíly mezi nerekurentními nádory (NR) a primárními rekurentními nádory (R1), konkrétně podíly velikostních skupin 15 až 60 px.

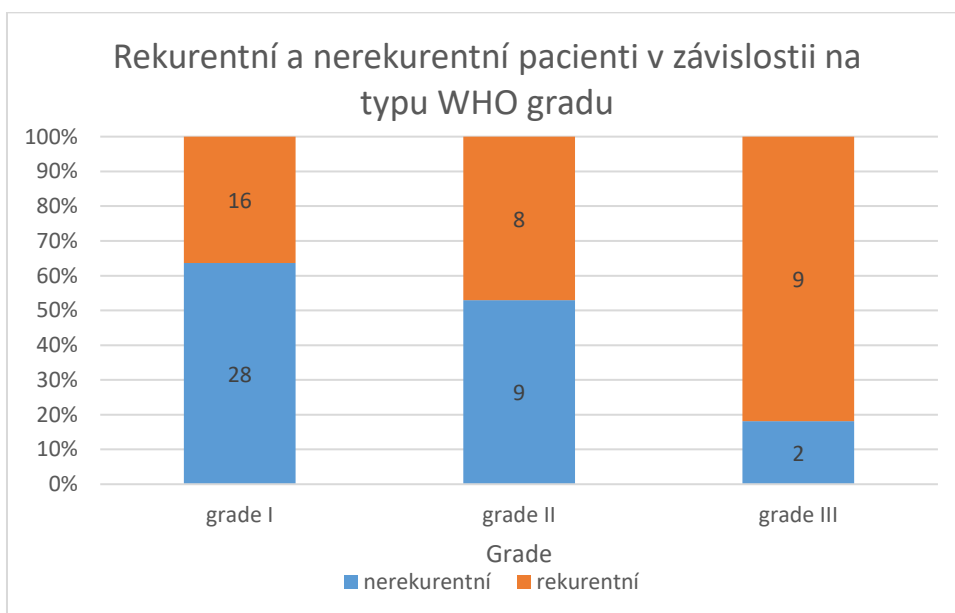
Krabicové diagramy znázorňují počet svítících bodů ve vzorku v závislosti na nerekurentních nádorech (NR) a primárních rekurentních nádorech (R1). Krabicový diagram znázorňuje 1. a 3. kvartil, linie vycházející ze střední části diagramu znázorňují minimální a maximální hodnoty a horizontální linie udává medián hodnot. Signifikantní výsledky byly zjištěny u bodů o velikostním rozmezí 15 až 60 px, nacházející se na hladině významnosti $p \leq 0,05$. U rekurentních nádorů (R1) dochází u výše zmíněných velikostních kategorií ke snížení počtu bodů oproti nerekurentním pacientům (NR).

Dále byly analyzovány souvislosti mezi WHO gradem a dalšími parametry. Na obr. 26 níže je vyznačen soubor všech 123 pacientů, vybraných pro tuto studii. Je zde zřejmá závislost rekurence na WHO gradu, což je již známý rizikový faktor pro rekurenci. Je zde vyšší zastoupení nerekurentních meningiomů WHO gradu I a nárůst rekurentních pacientů s WHO gradem III.



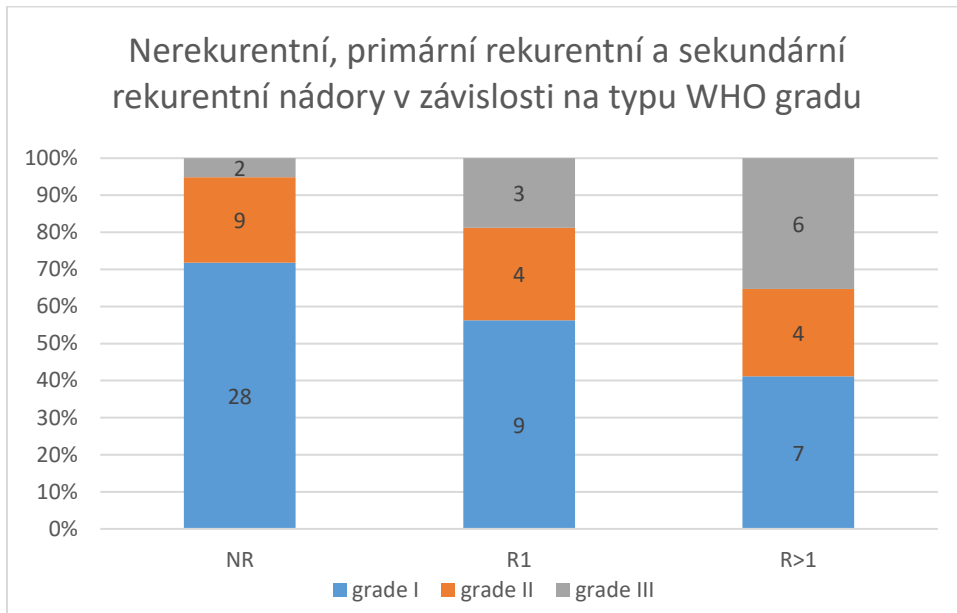
Obr. 26: Porovnání všech nerekurentních a rekurentních pacientů v závislosti na typu WHO gradu.

Ze 123 pacientů bylo vybráno pouze 72 pacientů, u kterých byl signál detekován a následně statisticky vyhodnocen. U pacientů byla provedena analýza WHO gradů v závislosti na rekurenci. Z obr. 27 je zřejmá závislost rekurence na WHO gradu i v našem souboru pacientů ($p = 0,026$). Vyšší WHO grade tedy vede k horší prognóze.



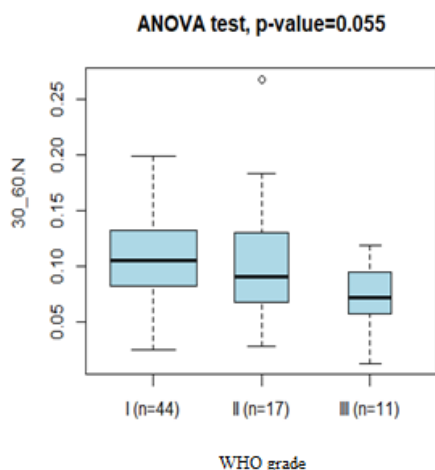
Obr. 27: Porovnání rekurentních a nerekurentních pacientů v závislosti na WHO gradu.

Na obr. 28 byly porovnány počty nerekurentních (NR), primárních rekurentních nádorů (R1) a sekundárních rekurentních nádorů (R>1) v závislosti na WHO gradu ($p = 0,053$). Je zde zřejmé, že po rekurenci primárních nádorů dochází k progresi do vyššího WHO gradu. Častěji tedy bývá vyšší WHO grade diagnostikován u sekundárních nádorů, což je zjevné i z našeho souboru pacientů.



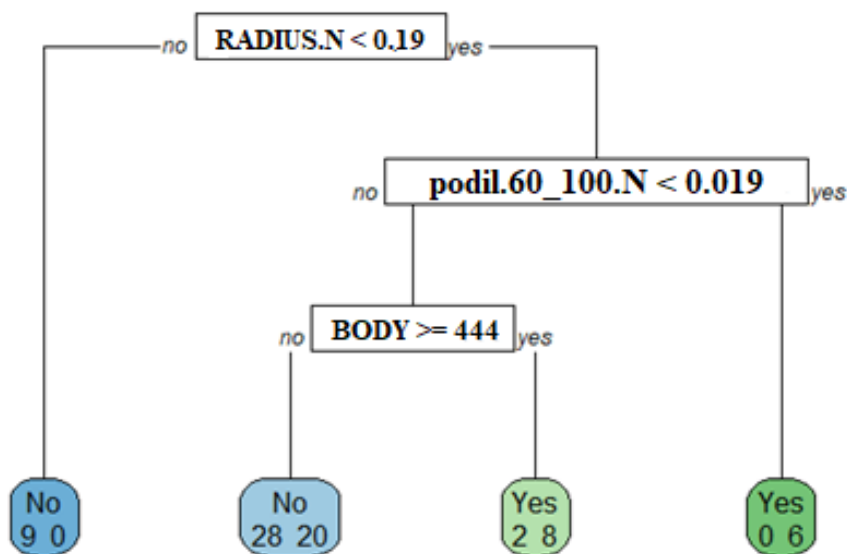
Obr. 28: Porovnání nerekurentních nádorů (NR), primárních rekurentních nádorů (R1) a sekundárních rekurentních nádorů (R>1) v závislosti na WHO gradu.

Co se týká analýzy exprese a lokalizace MEG3 v klastrech, v žádném ze zkoumaných parametrů nebyly nalezeny rozdíly mezi pacienty s různými WHO grady na hladině významnosti $p \leq 0,05$. Pouze objekty o velikosti 30 až 60 px vykazovaly nižší míru zastoupení se vzrůstajícím WHO gradem ($p = 0,055$). Z obr. 29 na druhé straně je patrné zastoupení těchto bodů, kdy nejvyšší je u WHO gradu I, naopak nejnižší počet je u WHO gradu III.



Obr. 29: Podíl počtu bodů velikostní kategorie 30_60 v závislosti na WHO gradu.

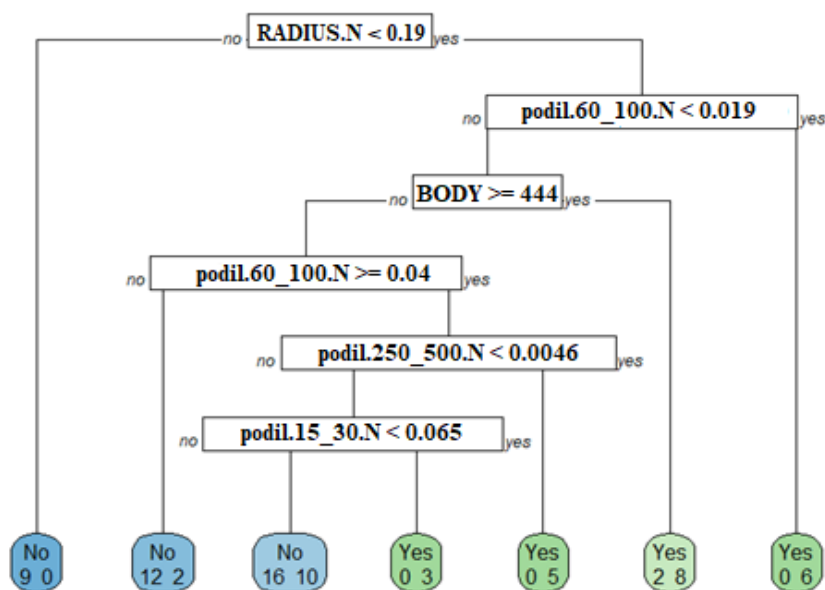
Pro 73 vzorků s alespoň 3 ROIs (odebrány vzorky pod 5% kvantilem) byl vytvořen klasifikační strom (obr. 30), který představoval výstup multivariátního modelu predikující rekurenci na základě vybraných parametrů (rekurence, BODY, RADIUS.N, podíly počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií a WHO grade). Model predikuje rekurenci podle proměnných BODY (průměr počtu bodů ve vzorku), podílů počtu bodů velikostní kategorie 60 až 100 px na celkovém počtu ve vzorku a RADIUS.N. Žádná z vybraných proměnných se nevyskytuje ve statistických testech pro predikci rekurence.



Obr. 30: Klasifikační strom predikující rekurenci podle algoritmem vybraných proměnných.

Klasifikační strom vizualizuje postup a úspěšnost multivariátního modelu pro predikci rekurence. Subjekty označené a zařazené do „No“, byly klasifikačním stromem předpovězeny jako nerekurentní. Dvojice čísel udává, kolik skutečně nerekurentních (číslo vlevo) a rekurentních (číslo vpravo) bylo do dané skupinky modelem zařazeno. Subjekty označené „Yes“ byly předpovězeny jako rekurentní a čísla vpravo ukazují skutečně rekurentní a čísla vlevo nerekurentní, které byly podle klasifikačního stromu do této skupinky zařazeny. Čím je barva jednotlivých koncových rozhodnutí tmavší, tím je klasifikační strom předpověděl správněji. Klasifikační strom nesprávně zařadil 5 % nerekurentních vzorků a 59 % vzorků rekurentních. Celková chyba předpovědi činí 30 %.

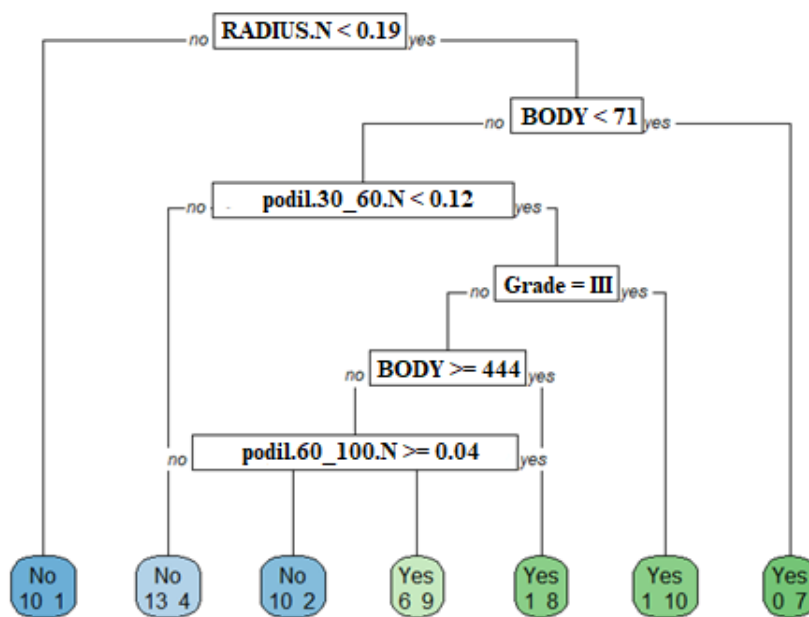
Další vygenerovaný model na základě stejných vstupních dat a podmínek byl vytvořen na obr. 31. Model predikuje jednotlivé rekurentní/nerekurentní vzorky podle RADIUS.N, BODY a podílu počtu bodů velikostních kategorií 15 až 30 px, 60 až 100 px a 250 až 500 px. Podíl počtu bodů velikostní kategorie 15 až 30 px ($p = 0,006$) vzhledem k rekurenci se vyskytuje ve statistických testech jako jediná signifikantní proměnná. Pro klasifikační strom byla vypočítána celková chyba předpovědi, která činí 19,2 %.



Obr. 31: Větvený klasifikační strom rozdělující rekurentní a nerekurentní nádory dle daných proměnných.

Klasifikační stromy rozdělily rekurentní a nerekurentní nádory na základě vybraných hodnot. Subjekty byly hodnoceny stejným způsobem jako na obr. 29. Klasifikační strom nesprávně zařadil 5 % nerekurentních pacientů a 35 % rekurentních pacientů. Celková chyba předpovědi činí 19,2 %.

Pro všech 82 vzorků byl vytvořen klasifikační strom (obr. 32), který představoval výstup multivariátního modelu predikující nerekurentní/rekurentní vzorky na základě vybraných parametrů (rekurence, BODY, RADIUS.N, podíl počtu jednotlivých velikostních kategorií a WHO grade). Model predikuje jednotlivé rekurentní/nerekurentní vzorky podle RADIUS.N, BODY, podílu počtu bodů velikostních kategorií 30 až 60 px a 60 až 100 px a WHO gradu. Podíl počtu bodů velikostní kategorie 30 až 60 px ($p = 0,016$) vzhledem k rekurenci se vyskytuje ve statistických testech jako jediná signifikantní proměnná. Zastoupení podílu počtu bodů této velikostní kategorie se nachází u rekurentních pacientů v nižší míře.



Obr. 32: Větvený klasifikační strom rozdělující rekurentní a nerekurentní nádory dle daných proměnných.

Klasifikační stromy rozdělily rekurentní a nerekurentní nádory na základě vybraných hodnot. Subjekty byly hodnoceny stejným způsobem jako na obr. 29. Klasifikační strom nesprávně zařadil 19,5 % nerekurentních pacientů a 17 % rekurentních pacientů. Celková chyba předpovědi činí 18,3 %.

Méně rozvětvený klasifikační strom rozděljuje vzorky dle tří proměnných (obr. 30). Jeho celková chybovost byla 30 %. U větvených klasifikačních stromů (obr. 31 a 32) byla vypočítána celková chybovost nižší (19,2 % a 18,3 %), avšak vzorky jsou děleny dle vyššího počtu parametrů. Je tedy možné, že by fungovaly jen na těchto konkrétních datech. Klasifikační stromy zařazují nepřesně zejména vzorky rekurentní, pravděpodobně z důvodu jejich menšího zastoupení mezi 73 pacienty. V klasifikačních stromech jsou mezi rekurentními a nerekurentními pacienty signifikantní rozdíly, avšak ne tak markantní, aby byly použity v rámci predikčního modelu.

6 Diskuze

Trvalé histologické tkáně se získávají stabilizací čerstvého materiálu. Fixací dochází k zachování struktury buněk a tkání, které jsou co nejpodobnější jejich výskytu *in vivo*. Fixace lze dosáhnout fixačními roztoky (vodný roztok formaldehydu), zmrazením tkáně nebo teplem. Nejčastější a nejšetrnější metodou je použití formaldehydu. Tkáň se vloží do vhodné formy, odvodní se, projasní a následně prosytí. V posledním kroku se tkáň zalije parafinem pro její zpevnění¹⁴². Výhodou formaldehydu je jeho nízká cena a rychlé pronikání do tkáně. Nevýhodou je částečná změna struktury buněk a chemická modifikace například aminových a amidových skupin v proteinech¹⁴⁷.

Pro experimentální pokusy byly k dispozici již předpřipravené starší bločky, u kterých byla provedena RNA *in situ* hybridizace. Během přípravy preparátů byla problémem heterogenita tkání, která mohla být zapříčiněna právě použitím formaldehydu. Po optimalizaci přípravy řezů tkáňových bločků (řezy 5 μm), metody barvení jader (použití DAPI) a dehydratace (při RT, 20-30 minut) byla provedena u všech sklíček vizualizace lncRNA pomocí RNA *in situ* hybridizace.

LncRNA jsou nejčastěji detekovány pomocí RT-qPCR. Ve studii Cabili *et al.* byla použita jednomolekulová RISH metoda k lokalizaci lncRNA uvnitř buněk. Jedná se konkrétně o RNAscope metodu, která se stala velmi přesnou a specifickou, a proto byla v této diplomové práci také použita. Leucci *et al.* a Dunagin *et al.* uvádí výhody metody oproti RT-qPCR. Metoda RT-qPCR není schopna rozlišovat typy buněk, jejich jednotlivé populace ve tkáni a umístění transkriptů¹⁴⁸. Díky metodě RISH lze kombinovat histologické a morfologické informace s lokalizací a expresí lncRNA^{149,150}. Pochopení lokalizace a exprese lncRNA dle Tripathi *et al.* může být užitečné při vývoji efektivnějších terapeutických postupů¹⁴⁸.

Dříve byl problémem RISH metody šum a slabá citlivost. Cabili *et al.* popisují koncepci Z sondy v RNAscope metodě, která zajišťuje selektivní zesílení signálů a zabránění amplifikace z nespecifických vazeb. Zlepšila se tak citlivost a poměr signál-šum, kdy je možné detekovat lncRNA s přesností na jednotky molekul¹⁵¹.

Následně byly snímány jednotlivé preparáty pomocí fluorescenčního mikroskopu, provedena obrazová analýza a statistické hodnocení. Během homogenního focení pomocí fluorescenčního mikroskopu byly všechny preparáty nafoceny stejným způsobem. Bohužel některé preparáty mohou být přесvíceny a u některých signál chybí. Dále je možné preparáty detekovat každý

jiným způsobem, ale je potřeba jasně daných pravidel. Během výzkumu však nebyl prostor pro další experimentální pokusy, které by se zabývaly zejména zlepšením metody snímání.

Pomocí obrazové analýzy bylo na každém terčíku vybráno 3-6 míst zájmu (ROIs), které obsahovaly signál, neobsahovaly artefakty a byly nasnímány v dostatečné kvalitě. Cabili *et al.* použili rovněž RISH k lokalizaci a četnosti lncRNA. Ve studii poukazují na hojnost lncRNA ve shlucích, proto jsme se v této práci rozhodli analyzovat podíly počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií¹⁵¹.

Pro statistické hodnocení vybráno 13 TMA s 82 pacienty, kde byl signál dostatečně dobře detekovatelný. Z 82 pacientů byli vybráni pacienti s alespoň 3 ROIs (odebrány vzorky pod 5% kvantilem) a ve výsledku tedy byla použita data 73 pacientů.

Nejprve byly jednotlivé ROIs hodnoceny podle procenta svítící plochy, avšak toto hodnocení nebylo vhodné. V heat mapě nedošlo ke klastrování jednotlivých podílů velikostních kategorií na svítící ploše a nebyly nalezeny signifikantní rozdíly mezi jednotlivými podíly v závislosti na rekurenci. Proto byly ve výsledku hodnoceny počty bodů jednotlivých velikostních kategorií za daný vzorek. Počty bodů byly trojčlenkou přepočteny na stejnou velikost (medián všech ROIs) a byl vytvořen průměrný počet bodů jednotlivých velikostních kategorií v daném vzorku (průměry z hodnot ROIs daného vzorku).

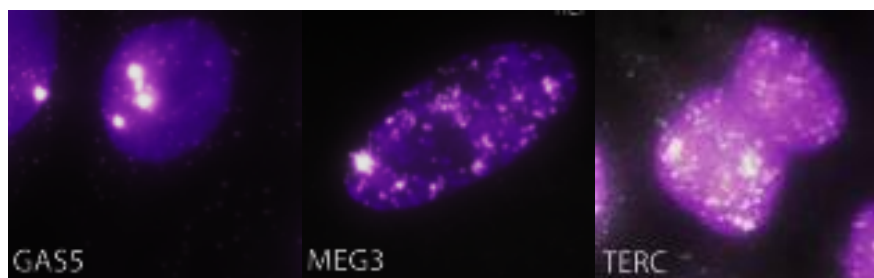
Byly statisticky vyhodnoceny normalizované počty bodů v jednotlivých ROIs u daných vzorků a průměrné počty bodů pro jednotlivé vzorky (BODY). Hodnota BODY byla u čtyř vzorků vyhodnocena vyšší než 1000 bodů, avšak nebyla mezi nimi nalezena žádná spojitost.

Pro všech 73 vzorků bylo provedeno hierarchické klastrování, kde došlo ke klastrování hodnot v rámci počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií. Nedošlo však ke klastrování v rámci rekurence, WHO gradu ani pořadí nádoru.

V následujících analýzách bylo provedeno porovnání hodnot podílu počtu bodů jednotlivých velikostních kategorií vzhledem k rekurenci. Byly nalezeny signifikantní rozdíly počtu bodů velikostní kategorie (15 až 30 px a 30 až 60 px). Detekce nejmenších bodů je výrazně vyšší u rekurentních nádorů, avšak při detekci větších bodů (nad 150 px) nedocházelo k signifikantním rozdílům. Díky tomuto hodnocení se naskýtá myšlenka, zda se nejedná o artefakty, vzhledem k jejich nízkému zastoupení, a zda je třeba tyto větší body detekovat. Bohužel nebyla nalezena spojitost s literaturou.

Následně byly porovnány hodnoty podílu počtu bodů velikostních kategorií v závislosti na třech proměnných, a to nerekurentní nádory (NR), primární rekurentní nádory (R1) a sekundární rekurentní nádory (R>1). Během hodnocení byl zaznamenán nižší počet bodů ve velikostní kategorii 15 až 30 px ($p = 0,02$) u primárních rekurentních nádorů (R1). Klasifikační stromy (obr. 30, 31, 32) predikovaly rekurentní/nerekurentní pacienty na základě vybraných parametrů, avšak jediný vygenerovaný model na obr. 32 vybral WHO grade jako jeden z prediktorů rekurence. Vygenerované modely měly tyto chybovosti 30 %, 19,2 % a 18,3 %.

Studie Cabili *et al.* udává u MEG3 rozptýlenější, prostorově skvrnitý vzor (obr. 32) oproti jiným lncRNA (GAS5 a TERC)¹⁵¹. V diplomové práci byly při focení detekovány jednotlivé transkripty genu MEG3 stejným způsobem. Částice byly identifikovány pomocí prahu intenzity, nad kterým byly jednotlivé tečky považovány za částici RNA¹⁵¹.



Obr. 33: Rozptýlení jednotlivých lncRNA ve tkáni.

RNAscope metoda by mohla být dle Tripathi *et al.* použita jako diagnostický detekční test za použití lncRNA jako biomarkeru. V laboratorních a klinických podmínkách by tato metoda mohla potvrdit výsledky získané pomocí RT-qPCR a posílit tak interpretaci chování nádorové tkáně¹⁴⁸. Tripathi *et al.* objevili spojitost mezi zvýšenou expresí lncRNA MALAT1 a stádiem kolorektálního karcinomu¹⁴⁸. V této diplomové práci však nebyla zjištěna dostatečně významná spojitost mezi MEG3 a WHO gradem.

7 Závěr

Meningiomy patří mezi častá nádorová onemocnění centrální nervové soustavy. Častým problémem těchto nádorových onemocnění je jejich rekurence v průběhu 5 až 10 let, dokonce i benigních forem^{5,7,12}. Často u nich dochází k ztrátě chromozomu, konkrétně chromozomu 22, 1 a 14. Bylo zjištěno, že ztráta chromozomu 14 se vyskytuje zejména u vyšších WHO gradů. Na chromozomu 14 se vyskytuje právě gen MEG3, který by mohl být ideálním prognostickým biomarkerem u meningiomů.

Cílem diplomové práce bylo zachycení transkriptu genu MEG3 pomocí RNA in situ hybridizace a následně transkript v tkáňových řezech lokalizovat. Díky statistickému hodnocení byly jednotlivé velikostní kategorie, množství a odchylky v rámci jednoho vzorku v signálu MEG3 korelovány s prognózou pacientů a nebyla nalezena souvislost mezi MEG3 a jednotlivými WHO grady. Nicméně byla potvrzena častější rekurence u vyšších WHO gradů ($p = 0,026$). U rekurentních a nerekurentních pacientů se liší rozdíly velikostních kategorií 1 až 15 px ($p = 0,021$), 15 až 30 px ($p = 0,006$) a 30 až 60 px ($p = 0,016$), neliší se v celkové expresi (BODY) a RADIUS.N (odchylky v rámci jednoho vzorku).

Metoda RNA in situ hybridizace se jeví jako vhodná metoda pro hodnocení lokalizace a exprese lncRNA, ale je potřeba metodu upravit a zdokonalit. Během diplomové práce byly zjištěny signifikantní rozdíly, avšak zatím nevhodné pro využití v klinické praxi pro předpověď prognózy. Tuto skutečnost potvrzují modely prezentované formou klasifikačních stromů, které jako hlavní faktory predikce rekurence vybíraly přednostně parametry BOD a RADIUS.N, přestože v jednotlivých statistických testech nevykazovaly signifikantní rozdíly mezi vzorky rekurentních a nerekurentních pacientů.

8 Literatura

- (1) Kung, J. T. Y.; Colognori, D.; Lee, J. T. Long Noncoding RNAs: Past, Present, and Future. **2013**, *193* (March), 651–669. <https://doi.org/10.1534/genetics.112.146704>.
- (2) Miyoshi, N.; Wagatsuma, H.; Wakana, S.; Shiroishi, T.; Nomura, M.; Aisaka, K.; Kohda, T.; Azim Surani, M.; Kaneko-Ishino, T.; Ishino, F. Identification of an Imprinted Gene, Meg3/Gtl2 and Its Human Homologue MEG3, First Mapped on Mouse Distal Chromosome 12 and Human Chromosome 14q. *Genes to Cells* **2000**, *5* (3), 211–220. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2000.00320.x>.
- (3) Zhou, Y.; Zhong, Y.; Wang, Y.; Zhang, X.; Batista, D. L.; Gejman, R.; Ansell, P. J.; Zhao, J.; Weng, C.; Klibanski, A. Activation of P53 by MEG3 Non-Coding RNA. *J. Biol. Chem.* **2007**, *282* (34), 24731–24742. <https://doi.org/10.1074/jbc.M702029200>.
- (4) Liu, J.; Li, Q.; Zhang, K. shan; Hu, B.; Niu, X.; Zhou, S. min; Li, S. guang; Luo, Y. ping; Wang, Y.; Deng, Z. feng. Downregulation of the Long Non-Coding RNA Meg3 Promotes Angiogenesis After Ischemic Brain Injury by Activating Notch Signaling. *Mol. Neurobiol.* **2017**, *54* (10), 8179–8190. <https://doi.org/10.1007/s12035-016-0270-z>.
- (5) Apra, C.; Peyre, M.; Kalamarides, M. Current Treatment Options for Meningioma. *Expert Rev. Neurother.* **2018**, *18* (3), 241–249. <https://doi.org/10.1080/14737175.2018.1429920>.
- (6) Rogers, L.; Barani, I.; Chamberlain, M.; Kaley, T. J.; McDermott, M.; Raizer, J.; Schiff, D.; Weber, D. C.; Wen, P. Y.; Vogelbaum, M. A. Meningiomas: Knowledge Base, Treatment Outcomes, and Uncertainties. A RANO Review. *J. Neurosurg.* **2015**, *122* (1), 4–23. <https://doi.org/10.3171/2014.7.JNS131644>.
- (7) Zhang, X.; Gejman, R.; Mahta, A.; Zhong, Y.; Rice, K. A.; Zhou, Y.; Cheunsuchon, P.; Louis, D. N.; Klibanski, A. Maternally Expressed Gene 3, an Imprinted Noncoding RNA Gene, Is Associated with Meningioma Pathogenesis and Progression. *Cancer Res.* **2010**, *70* (6), 2350–2358. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-09-3885>.
- (8) Domingues, P.; González-Tablas, M.; Otero, Á.; Pascual, D.; Ruiz, L.; Miranda, D.; Sousa, P.; Gonçalves, J. M.; Lopes, M. C.; Orfao, A.; Taberner, M. D. Genetic/Molecular Alterations of Meningiomas and the Signaling Pathways Targeted. *Oncotarget* **2015**, *6* (13), 10671–10688. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.3870>.
- (9) Bondy, M.; Lee Ligon, B. Epidemiology and Etiology of Intracranial Meningiomas: A

- Review. *J. Neurooncol.* **1996**, 29 (3), 197–205. <https://doi.org/10.1007/BF00165649>.
- (10) Cushing, H. The Meningiomas (Dural Endotheliomas): Their Source, and Favoured Seats of Origin. *Brain* **1922**, 45 (2), 282–316. <https://doi.org/10.1093/brain/45.2.282>.
- (11) Harter, P. N.; Braun, Y.; Plate, K. H. Classification of Meningiomas-Advances and Controversies. *Chinese Clin. Oncol.* **2017**, 6 (2), 1–8. <https://doi.org/10.21037/cco.2017.05.02>.
- (12) Papaioannou, M.-D.; Djuric, U.; Kao, J.; Karimi, S.; Zadeh, G.; Aldape, K.; Diamandis, P. Proteomic Analysis of Meningiomas Reveals Clinically Distinct Molecular Patterns. *Neuro. Oncol.* **2019**, 21 (8), 1028–1038. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noz084>.
- (13) Barresi, V.; Caffo, M.; Tuccari, G. Classification of Human Meningiomas: Lights, Shadows, and Future Perspectives. *J. Neurosci. Res.* **2016**, 94 (12), 1604–1612. <https://doi.org/10.1002/jnr.23801>.
- (14) Ayerbe, J.; Lobato, D. R.; De la Cruz, J.; Alday, R.; Rivas, J. J.; Gómez, P. A.; Cabrera, A. Risk Factors Predicting Recurrence in Patients Operated on for Intracranial Meningioma. A Multivariate Analysis. *Acta Neurochir. (Wien)*. **1999**, 141 (9), 921–932. <https://doi.org/10.1007/s007010050398>.
- (15) Espinosa, A. B.; Taberner, M. D.; Maíllo, A.; Sayagués, J. M.; Ciudad, J.; Merino, M.; Alguero, M. C.; Lubombo, A. M.; Sousa, P.; Santos-Briz, A.; Orfao, A. The Cytogenetic Relationship between Primary and Recurrent Meningiomas Points to the Need for New Treatment Strategies in Cases at High Risk of Relapse. *Clin. Cancer Res.* **2006**, 12 (3 I), 772–780. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-05-1480>.
- (16) Louis, D. N.; Perry, A.; Reifenberger, G.; von Deimling, A.; Figarella-Branger, D.; Cavenee, W. K.; Ohgaki, H.; Wiestler, O. D.; Kleihues, P.; Ellison, D. W. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Acta Neuropathol.* **2016**, 131 (6), 803–820. <https://doi.org/10.1007/s00401-016-1545-1>.
- (17) Fathi, A. R.; Roelcke, U. Meningioma. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* **2013**, 13 (4). <https://doi.org/10.1007/s11910-013-0337-4>.
- (18) Watts, J.; Box, G.; Galvin, A.; Brotchie, P.; Trost, N.; Sutherland, T. Magnetic

- Resonance Imaging of Meningiomas: A Pictorial Review. *Insights Imaging* **2014**, 5 (1), 113–122. <https://doi.org/10.1007/s13244-013-0302-4>.
- (19) Perry, A. Meningiomas. *Pract. Surg. Neuropathol.* **2018**, 259–298. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-44941-0.00013-8>.
- (20) Ayoubi, S.; Dunn, I. F.; Al-Mefty, O. Meningiomas. *Brain Tumors* **2012**, 600–629. <https://doi.org/10.1016/B978-0-443-06967-3.00031-4>.
- (21) Menke, J. R.; Raleigh, D. R.; Gown, A. M.; Thomas, S.; Perry, A.; Tihan, T. Somatostatin Receptor 2a Is a More Sensitive Diagnostic Marker of Meningioma than Epithelial Membrane Antigen. *Acta Neuropathol.* **2015**, 130 (3), 441–443. <https://doi.org/10.1007/s00401-015-1459-3>.
- (22) Boulagnon-Rombi, C.; Fleury, C.; Fichel, C.; Lefour, S.; Bressenot, A. M.; Gauchotte, G. Immunohistochemical Approach to the Differential Diagnosis of Meningiomas and Their Mimics. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **2017**, 76 (4), 289–298. <https://doi.org/10.1093/jnen/nlx008>.
- (23) Perry, A.; Gutmann, D. H.; Reifenberger, G. Molecular Pathogenesis of Meningiomas. *J. Neurooncol.* **2004**, 70 (2), 183–202. <https://doi.org/10.1007/s11060-004-2749-0>.
- (24) Lee, Y. S.; Lee, Y. S. Molecular Characteristics of Meningiomas. *J. Pathol. Transl. Med.* **2020**, 54 (1), 45–63. <https://doi.org/10.4132/jptm.2019.11.05>.
- (25) Pasquier, Basile, Gasner, Françoise, Pasquier, Dominique, Keddari, Eric, Morens, Annie, C. P. Papillary Meningioma: Clinicopathologic Study of Seven Cases and Review of the Literature. *Cancer* **1986**, 58, 299–305. [https://doi.org/10.1002/1097-0142\(19860715\)58:2<299::aid-cnrc2820580215>3.0.co;2-w](https://doi.org/10.1002/1097-0142(19860715)58:2<299::aid-cnrc2820580215>3.0.co;2-w).
- (26) Riemenschneider, M. J.; Perry, A.; Reifenberger, G. Histological Classification and Molecular Genetics of Meningiomas. *Lancet Neurol.* **2006**, 5 (12), 1045–1054. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(06\)70625-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(06)70625-1).
- (27) Goldbrunner, R.; Minniti, G.; Preusser, M.; Jenkinson, M. D.; Sallabanda, K.; Houdart, E.; von Deimling, A.; Stavrinou, P.; Lefranc, F.; Lund-Johansen, M.; Moyal, E. C. J.; Brandsma, D.; Henriksson, R.; Soffietti, R.; Weller, M. EANO Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Meningiomas. *Lancet Oncol.* **2016**, 17 (9), e383–e391. [https://doi.org/10.1016/S1470-2045\(16\)30321-7](https://doi.org/10.1016/S1470-2045(16)30321-7).

- (28) Buerki, R. A.; Horbinski, C. M.; Kruser, T.; Horowitz, P. M.; James, C. D.; Lukas, R. V. An Overview of Meningiomas. *Futur. Oncol.* **2018**, *14* (21), 2161–2177. <https://doi.org/10.2217/fon-2018-0006>.
- (29) Nanda, A.; Bir, S. C.; Maiti, T. K.; Konar, S. K.; Missios, S.; Guthikonda, B. Relevance of Simpson Grading System and Recurrence-Free Survival after Surgery for World Health Organization Grade I Meningioma. *J. Neurosurg.* **2017**, *126* (1), 201–211. <https://doi.org/10.3171/2016.1.JNS151842>.
- (30) Yuzawa, S.; Nishihara, H.; Tanaka, S. Genetic Landscape of Meningioma. *Brain Tumor Pathol.* **2016**, *33* (4), 237–247. <https://doi.org/10.1007/s10014-016-0271-7>.
- (31) Morrow, K. A.; Shevde, L. a. Merlin: The Wizard Requires Protein Stability to Function as a Tumor Suppressor: Is Stability Important for Tumour Suppressor Activity? *Biochim Biophys Acta* **2012**, *1826* (12), 400–406. <https://doi.org/10.1016/j.bbcan.2012.06.005.Merlin>.
- (32) Galani, V.; Lampri, E.; Varouktsi, A.; Alexiou, G.; Mitselou, A.; Kyritsis, A. P. Genetic and Epigenetic Alterations in Meningiomas. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2017**, *158*, 119–125. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2017.05.002>.
- (33) Barski, D.; Wolter, M.; Reifenberger, G.; Riemenschneider, M. J. Hypermethylation and Transcriptional Downregulation of the TIMP3 Gene Is Associated with Allelic Loss on 22q12.3 and Malignancy in Meningiomas. *Brain Pathol.* **2010**, *20* (3), 623–631. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3639.2009.00340.x>.
- (34) Pereira, B. J. A.; Oba-Shinjo, S. M.; de Almeida, A. N.; Marie, S. K. N. Molecular Alterations in Meningiomas: Literature Review. *Clin. Neurol. Neurosurg.* **2019**, *176* (December 2018), 89–96. <https://doi.org/10.1016/j.clineuro.2018.12.004>.
- (35) Zhi, F.; Zhou, G.; Wang, S.; Shi, Y.; Peng, Y.; Shao, N.; Guan, W.; Qu, H.; Zhang, Y.; Wang, Q.; Yang, C.; Wang, R.; Wu, S.; Xia, X.; Yang, Y. A MicroRNA Expression Signature Predicts Meningioma Recurrence. *Int. J. Cancer* **2013**, *132* (1), 128–136. <https://doi.org/10.1002/ijc.27658>.
- (36) Voet, Donald, V. J. G. *Biochemie*; Praha: Victoria Publishing, 1995.
- (37) Koolman Jan, R. K.-H. *Barevný Atlas Biochemie*, 4.; Praha: Grada, 2012.
- (38) Soediono, B. Alberts - Molecular Biology Of The Cell 4th Ed. *J. Chem. Inf. Model.*

- 1989**, 53, 160. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>.
- (39) Wilusz, J. E.; Sunwoo, H.; Spector, D. L. Long Noncoding RNAs: Functional Surprises from the RNA World. *Genes Dev.* **2009**, 23 (13), 1494–1504. <https://doi.org/10.1101/gad.1800909>.
- (40) Dhanoa, J. K.; Sethi, R. S.; Verma, R.; Arora, J. S.; Mukhopadhyay, C. S. Long Non-Coding RNA: Its Evolutionary Relics and Biological Implications in Mammals: A Review. *Journal of Animal Science and Technology*. Journal of Animal Science and Technology 2018, pp 1–10. <https://doi.org/10.1186/s40781-018-0183-7>.
- (41) Orgel, L. E.; Crick, F. H. C. Selfish DNA: The Ultimate Parasite. *Nature* **1980**, 284, 604–607. <https://doi.org/https://doi.org/10.1038/284604a0>.
- (42) Liu, G.; Mattick, J. S.; Taft, R. J. A Meta-Analysis of the Genomic and Transcriptomic Composition of Complex Life. *Cell Cycle* **2013**, 12 (13), 2061–2072. <https://doi.org/10.4161/cc.25134>.
- (43) Mirsky A. E., R. H. The Desoxyribonucleic Acid Content of Animal Cells and Its Evolutionary Significance. *J. Gen. Physiol.* **1950**, 34 (4), 451–462. <https://doi.org/10.1085/jgp.34.4.451>.
- (44) Gall, J. G. Chromosome Structure and the C-Value Paradox. *Journal of Cell Biology*. 1981, pp 3–14. <https://doi.org/10.1083/jcb.91.3.3s>.
- (45) Thomas, C. A. The Genetic Organization of Chromosomes. *Annu. Rev. Genet.* **1971**, 5 (1), 237–256. <https://doi.org/10.1146/annurev.ge.05.120171.001321>.
- (46) Derrien, T.; Johnson, R.; Bussotti, G.; Tanzer, A.; Djebali, S.; Tilgner, H.; Guernec, G.; Martin, D.; Merkel, A.; Knowles, D. G.; Lagarde, J.; Veeravalli, L.; Ruan, X.; Ruan, Y.; Lassmann, T.; Carninci, P.; Brown, J. B.; Lipovich, L.; Gonzalez, J. M.; Thomas, M.; Davis, C. A.; Shiekhattar, R.; Gingeras, T. R.; Hubbard, T. J.; Notredame, C.; Harrow, J.; Guigó, R. The GENCODE v7 Catalog of Human Long Noncoding RNAs: Analysis of Their Gene Structure, Evolution, and Expression. *Genome Res.* **2012**, 22 (9), 1775–1789. <https://doi.org/10.1101/gr.132159.111>.
- (47) van Bakel, H.; Nislow, C.; Blencowe, B. J.; Hughes, T. R. Most “Dark Matter” Transcripts Are Associated with Known Genes. *PLoS Biol.* **2010**, 8 (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1000371>.

- (48) Cabili, M.; Trapnell, C.; Goff, L.; Koziol, M.; Tazon-Vega, B.; Regev, A.; Rinn, J. L. Integrative Annotation of Human Large Intergenic Noncoding RNAs Reveals Global Properties and Specific Subclasses. *Genes Dev.* **2011**, *25* (18), 1915–1927. <https://doi.org/10.1101/gad.17446611>.
- (49) Ponting, C. P.; Oliver, P. L.; Reik, W. Evolution and Functions of Long Noncoding RNAs. *Cell* **2009**, *136* (4), 629–641. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.02.006>.
- (50) Clark, M. B.; Mattick, J. S. Long Noncoding RNAs in Cell Biology. *Semin. Cell Dev. Biol.* **2011**, *22* (4), 366–376. <https://doi.org/10.1016/j.semcdb.2011.01.001>.
- (51) Martianov, I.; Ramadass, A.; Serra Barros, A.; Chow, N.; Akoulitchev, A. Repression of the Human Dihydrofolate Reductase Gene by a Non-Coding Interfering Transcript. *Nature* **2007**, *445* (7128), 666–670. <https://doi.org/10.1038/nature05519>.
- (52) Rinn, J. L.; Kertesz, M.; Wang, J. K.; Squazzo, S. L.; Xu, X.; Brugmann, S. A.; Goodnough, L. H.; Helms, J. A.; Farnham, P. J.; Segal, E.; Chang, H. Y. Functional Demarcation of Active and Silent Chromatin Domains in Human HOX Loci by Noncoding RNAs. *Cell* **2007**, *129* (7), 1311–1323. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.05.022>.
- (53) Rintala-Maki, N. D.; Sutherland, L. C. Identification and Characterisation of a Novel Antisense Non-Coding RNA from the RBM5 Gene Locus. *Gene* **2009**, *445* (1–2), 7–16. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.06.009>.
- (54) Tripathi, V.; Ellis, J. D.; Shen, Z.; Song, D. Y.; Pan, Q.; Watt, A. T.; Freier, S. M.; Bennett, C. F.; Sharma, A.; Bubulya, P. A.; Blencowe, B. J.; Prasanth, S. G.; Prasanth, K. V. The Nuclear-Retained Noncoding RNA MALAT1 Regulates Alternative Splicing by Modulating SR Splicing Factor Phosphorylation. *Mol. Cell* **2010**, *39* (6), 925–938. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.08.011>.
- (55) Muddashetty, R. S.; Khanam, T.; Kondrashov, A.; Bundman, M.; Iacoangeli, A.; Kremerskothen, J.; Duning, K.; Barnekow, A.; Hüttenhofer, A.; Tiedge, H.; Brosius, J. Poly(A)-Binding Protein Is Associated with Neuronal BC1 and BC200 Ribonucleoprotein Particles. *J. Mol. Biol.* **2002**, *321* (3), 433–445. [https://doi.org/10.1016/S0022-2836\(02\)00655-1](https://doi.org/10.1016/S0022-2836(02)00655-1).
- (56) Beltran, M.; Puig, I.; Peña, C.; García, J. M.; Álvarez, A. B.; Peña, R.; Bonilla, F.; De Herreros, A. G. A Natural Antisense Transcript Regulates Zeb2/Sip1 Gene Expression

- during Snail1-Induced Epithelial-Mesenchymal Transition. *Genes Dev.* **2008**, *22* (6), 756–769. <https://doi.org/10.1101/gad.455708>.
- (57) Watanabe, Y.; Yamamoto, M. S. Pombe Mei2+ Encodes an RNA-Binding Protein Essential for Premeiotic DNA Synthesis and Meiosis I, Which Cooperates with a Novel RNA Species MeiRNA. *Cell* **1994**, *78* (3), 487–498. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90426-X](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90426-X).
- (58) Campalans, A.; Kondorosi, A.; Crespi, M. Enod40, a Short Open Reading Frame-Containing MRNA, Induces Cytoplasmic Localization of a Nuclear RNA Binding Protein in Medicago Truncatula. *Plant Cell* **2004**, *16* (4), 1047–1059. <https://doi.org/10.1105/tpc.019406>.
- (59) Sunwoo, H.; Dinger, M. E.; Wilusz, J. E.; Amaral, P. P.; Mattick, J. S.; Spector, D. L. Men ϵ/β Nuclear-Retained Non-Coding RNAs Are up-Regulated upon Muscle Differentiation and Are Essential Components of Paraspeckles. *Genome Res.* **2009**, *19* (3), 347–359. <https://doi.org/10.1101/gr.087775.108>.
- (60) Mourtada-Maarabouni, M.; Hedge, V. L.; Kirkham, L.; Farzaneh, F.; Williams, G. T. Growth Arrest in Human T-Cells Is Controlled by the Non-Coding RNA Growth-Arrest-Specific Transcript 5 (GAS5) (Journal of Cell Science 121 (939-946)). *J. Cell Sci.* **2010**, *123* (7), 1181. <https://doi.org/10.1242/jcs.070631>.
- (61) Ginger, M. R.; Shore, A. N.; Contreras, A.; Rijnkels, M.; Miller, J.; Gonzalez-Rimbau, M. F.; Rosen, J. M. A Noncoding RNA Is a Potential Marker of Cell Fate during Mammary Gland Development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **2006**, *103* (15), 5781–5786. <https://doi.org/10.1073/pnas.0600745103>.
- (62) Reeves, M. B.; Davies, A. A.; McSharry, B. P.; Wilkinson, G. W.; Sinclair, J. H. Complex I Binding by a Virally Encoded RNA Regulates Mitochondria-Induced Cell Death. *Science (80-.)*. **2007**, *316* (5829), 1345–1348. <https://doi.org/10.1126/science.1142984>.
- (63) Huarte, M.; Guttman, M.; Feldser, D.; Garber, M.; Koziol, M. J.; Kenzelmann-Broz, D.; Khalil, A. M.; Zuk, O.; Amit, I.; Rabani, M.; Attardi, L. D.; Regev, A.; Lander, E. S.; Jacks, T.; Rinn, J. L. A Large Intergenic Noncoding RNA Induced by P53 Mediates Global Gene Repression in the P53 Response. *Cell* **2010**, *142* (3), 409–419. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2010.06.040>.

- (64) Carninci, P.; Kasukawa, T.; Katayama, S.; Gough, J.; Frith, M. C.; Maeda, N.; Oyama, R.; Ravasi, T.; Lenhard, B.; Wells, C.; Kodzius, R.; Shimokawa, K.; Bajic, V. B.; Brenner, S. E.; Batalov, S.; Forrest, A. R. R.; Zavolan, M.; Davis, M. J.; Wilming, L. G.; Aidinis, V.; Allen, J. E.; Ambesi-Impombato, A.; Apweiler, R.; Aturaliya, R. N.; Bailey, T. L.; Bansal, M.; Baxter, L.; Beisel, K. W.; Bersano, T.; Bono, H.; Chalk, A. M.; Chiu, K. P.; Choudhary, V.; Christoffels, A.; Clutterbuck, D. R.; Crowe, M. L.; Dalla, E.; Dalrymple, B. P.; Bono, B.; Gatta, G. Della; Bernardo, D. Di; Down, T.; Engstrom, P.; Fagiolini, M.; Faulkner, G.; Fletcher, C. F.; Fukushima, T.; Furuno, M.; Futaki, S.; Gariboldi, M.; Georgii-Hemming, P.; Gingeras, T. R.; Gojobori, T.; Green, R. E.; Gustincich, S.; Harbers, M.; Hayashi, Y.; Hensch, T. K.; Hirokawa, N.; Hill, D.; Huminiecki, L.; Iacono, M.; Ikeo, K.; Iwama, A.; Ishikawa, T.; Jakt, M.; Kanapin, A.; Katoh, M.; Kawasawa, Y.; Kelso, J.; Kitamura, H.; Kitano, H.; Kollias, G.; Krishnan, S. P. T.; Kruger, A.; Kummerfeld, S. K.; Kurochkin, I. V.; Lareau, L. F.; Lazarevic, D.; Lipovich, L.; Liu, J.; Liuni, S.; McWilliam, S.; Babu, M. 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, K. C.; Pavan, W. J.; Pavesi, G.; Pesole, G.; Petrovsky, N.; Piazza, S.; Reed, J.; Reid, J. F.; Ring, B. Z.; Ringwald, M.; Rost, B.; Ruan, Y.; Salzberg, S. L.; Sandelin, A.; Schneider, C.; Schönbach, C.; Sekiguchi, K.; Semple, C. A. M.; 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.; Tammoya, K.; Tan, S. L.; Tang, S.; Taylor, M. S.; Tegner, J.; Teichmann, S. A.; Ueda, H. R.; Nimwegen, E.; Verardo, R.; Wei, C. L.; Yagi, K.; Yamanishi, H.; Zabarovsky, E.; Zhu, S.; Zimmer, A.; Hide, W.; Bult, C.; Grimmond, S. M.; Teasdale, R. D.; Liu, E. T.; Brusica, V.; Quackenbush, J.; Wahlestedt, C.; Mattick, J. S.; Hume, D. A.; 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. The Transcriptional Landscape of the Mammalian Genome. *Science* (80-.). **2005**, *309* (5740), 1559–1563. <https://doi.org/10.1126/science.1112014>.

- (65) Zhao, Y.; Li, H.; Fang, S.; Kang, Y.; Wu, W.; Hao, Y.; Li, Z.; Bu, D.; Sun, N.; Zhang, M. Q.; Chen, R. NONCODE 2016: An Informative and Valuable Data Source of Long Non-Coding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44* (D1), D203–D208.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkv1252>.
- (66) Bu, D.; Yu, K.; Sun, S.; Xie, C.; Skogerbø, G.; Miao, R.; Xiao, H.; Liao, Q.; Luo, H.; Zhao, G.; Zhao, H.; Liu, Z.; Liu, C.; Chen, R.; Zhao, Y. NONCODE v3.0: Integrative Annotation of Long Noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2012**, *40* (D1), 210–215.
<https://doi.org/10.1093/nar/gkr1175>.
- (67) Zhenyu Bao, Zhen Yang, Zhou Huang, Yiran Zhou, Qinghua Cui, and D. D. LncRNADisease 2.0: An Updated Database of Long Non-Coding RNA-Associated Diseases. *Nucleic Acids Research*. Oxford University Press 2019, pp D1034–D1037.
<https://doi.org/10.1093/nar/gky905>.
- (68) Xiu Cheng Quek, Daniel W. Thomson, Jesper L.V. Maag, Nenad Bartonicek, Bethany Signal, Michael B. Clark, B. S. G. and M. E. D. LncRNADB v2.0: Expanding the Reference Database for Functional Long Noncoding RNAs. *Nucleic Acids Research*. 2015, pp D168–D173. <https://doi.org/10.1093/nar/gku988>.
- (69) Amaral, P. P.; Clark, M. B.; Gascoigne, D. K.; Dinger, M. E.; Mattick, J. S. LncRNADB: A Reference Database for Long Noncoding RNAs. *Nucleic Acids Res.* **2011**, *39* (SUPPL. 1), 146–151. <https://doi.org/10.1093/nar/gkq1138>.
- (70) Volders, P. J.; Helsens, K.; Wang, X.; Menten, B.; Martens, L.; Gevaert, K.; Vandesompele, J.; Mestdagh, P. LNCipedia: A Database for Annotated Human lncRNA Transcript Sequences and Structures. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), 246–251. <https://doi.org/10.1093/nar/gks915>.
- (71) Volders, P. J.; Verheggen, K.; Menschaert, G.; Vandepoele, K.; Martens, L.; Vandesompele, J.; Mestdagh, P. An Update on LNCipedia: A Database for Annotated Human lncRNA Sequences. *Nucleic Acids Res.* **2015**, *43* (D1), D174–D180.
<https://doi.org/10.1093/nar/gku1060>.
- (72) Yang, J. H.; Li, J. H.; Jiang, S.; Zhou, H.; Qu, L. H. CHIPBase: A Database for Decoding the Transcriptional Regulation of Long Non-Coding RNA and MicroRNA Genes from ChIP-Seq Data. *Nucleic Acids Res.* **2013**, *41* (D1), 177–187.
<https://doi.org/10.1093/nar/gks1060>.

- (73) Li, Y. Y.; Qin, L.; Guo, Z. M.; Liu, L.; Xu, H.; Hao, P.; Su, J.; Shi, Y.; He, W. Z.; Li, Y. X. In Silico Discovery of Human Natural Antisense Transcripts. *BMC Bioinformatics* **2006**, *7*, 1–8. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-7-18>.
- (74) Barrell B.G., Air G. M., H. C. A. Overlapping Genes in Bacteriophage PhiX174. *Nature* **1976**, *264*, 34–41.
- (75) Knee, R.; Murphy, P. R. Regulation of Gene Expression by Natural Antisense RNA Transcripts. *Neurochem. Int.* **1997**, *31* (3), 379–392. [https://doi.org/10.1016/S0197-0186\(96\)00108-8](https://doi.org/10.1016/S0197-0186(96)00108-8).
- (76) Williams, T.; Fried, M. A Mouse Locus at Which Transcription from Both DNA Strands Produces MRNAs Complementary at Their 3' Ends. *Nature* **1986**, *322* (6076), 275–279. <https://doi.org/10.1038/322275a0>.
- (77) Lapidot, M.; Pilpel, Y. Genome-Wide Natural Antisense Transcription: Coupling Its Regulation to Its Different Regulatory Mechanisms. *EMBO Rep.* **2006**, *7* (12), 1216–1222. <https://doi.org/10.1038/sj.embor.7400857>.
- (78) Wight, M.; Werner, A. Europe PMC Funders Group The Functions of Natural Antisense Transcripts. *Essays Biochem.* **2013**, *54*, 91–101. <https://doi.org/10.1042/bse0540091.The>.
- (79) Balas, M. M.; Johnson, A. M. Exploring the Mechanisms behind Long Noncoding RNAs and Cancer. *Non-coding RNA Res.* **2018**, *3* (3), 108–117. <https://doi.org/10.1016/j.ncrna.2018.03.001>.
- (80) Khandelwal, A.; Bacolla, A.; Vasquez, K. M.; Jain, A. Long Non-Coding RNA: A New Paradigm for Lung Cancer. *Mol. Carcinog.* **2015**, *54* (11), 1235–1251. <https://doi.org/10.1002/mc.22362>.
- (81) Ma, L.; Bajic, V. B.; Zhang, Z. On the Classification of Long Non-Coding RNAs. *RNA Biol.* **2013**, *10* (6), 924–933. <https://doi.org/10.4161/rna.24604>.
- (82) Goyal, A.; Fiškin, E.; Gutschner, T.; Polycarpou-Schwarz, M.; Groß, M.; Neugebauer, J.; Gandhi, M.; Caudron-Herger, M.; Benes, V.; Diederichs, S. A Cautionary Tale of Sense-Antisense Gene Pairs: Independent Regulation despite Inverse Correlation of Expression. *Nucleic Acids Res.* **2017**, *45* (21), 12496–12508. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx952>.

- (83) Bär, C.; Chatterjee, S.; Thum, T. Long Noncoding RNAs in Cardiovascular Pathology, Diagnosis, and Therapy. *Circulation* **2016**, *134* (19), 1484–1499. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.116.023686>.
- (84) Wang, K. C.; Chang, H. Y. Molecular Mechanisms of Long Noncoding RNAs. *Mol. Cell* **2011**, *43* (6), 904–914. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2011.08.018>.
- (85) Devaux, Y.; Zangrando, J.; Schroen, B.; Creemers, E. E.; Pedrazzini, T.; Chang, C. P.; Dorn, G. W.; Thum, T.; Heymans, S. Long Noncoding RNAs in Cardiac Development and Ageing. *Nat. Rev. Cardiol.* **2015**, *12* (7), 415–425. <https://doi.org/10.1038/nrcardio.2015.55>.
- (86) Rinn, J. L.; Chang, H. Y. Genome Regulation by Long Noncoding RNAs. *Annu. Rev. Biochem.* **2012**, *81* (1), 145–166. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-051410-092902>.
- (87) Hung, T.; Wang, Y.; Lin, M. F.; Koegel, A. K.; Kotake, Y.; Grant, G. D.; Horlings, H. M.; Shah, N.; Umbricht, C.; Wang, P.; Wang, Y.; Kong, B.; Langerod, A.; Børresen-Dale, A.-L.; Kim, S. K.; van de Vijver, M.; Sukumar, S.; Whitfield, M. L.; Kellis, M.; Xiong, Y.; Wong, D. J.; Chang, H. Y.; Genot, N. Panda Lncrna. **2013**, *43* (7), 621–629. <https://doi.org/10.1038/ng.848>.
- (88) Spitale, R. C.; Tsai, M. C.; Chang, H. Y. RNA Templating the Epigenome: Long Noncoding RNAs as Molecular Scaffolds. *Epigenetics* **2011**, *6* (5), 539–543. <https://doi.org/10.4161/epi.6.5.15221>.
- (89) Gutschner, T.; Diederichs, S. The Hallmarks of Cancer: A Long Non-Coding RNA Point of View. *RNA Biol.* **2012**, *9* (6), 703–709. <https://doi.org/10.4161/rna.20481>.
- (90) Pontier, D. B.; Gribnau, J. Xist Regulation and Function EXplored. *Hum. Genet.* **2011**, *130* (2), 223–236. <https://doi.org/10.1007/s00439-011-1008-7>.
- (91) A, S.; E, S.; HM, E. T. The Long Non-Coding RNA XIST: A New Cornerstone in Carcinogenesis. *J. Mol. Genet. Med.* **2018**, *12* (2). <https://doi.org/10.4172/1747-0862.1000356>.
- (92) Weakley, S. M.; Wang, H.; Yao, Q.; Chen, C. Expression and Function of a Large Non-Coding RNA Gene XIST in Human Cancer. *World J. Surg.* **2011**, *35* (8), 1751–1756. <https://doi.org/10.1007/s00268-010-0951-0>.

- (93) Jurkiewicz, D.; Kugaud, M.; Skórka, A.; Śmigiel, R.; Smyk, M.; Ciara, E.; Chrzanowska, K.; Krajewska-Walasek, M. A Novel IGF2/H19 Domain Triplication in the 11p15.5 Imprinting Region Causing Either Beckwith–Wiedemann or Silver–Russell Syndrome in a Single Family. *Am. J. Med. Genet. Part A* **2017**, *173* (1), 72–78. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37964>.
- (94) Mussa, A.; Russo, S.; De Crescenzo, A.; Freschi, A.; Calzari, L.; Maitz, S.; Macchiaiolo, M.; Molinatto, C.; Baldassarre, G.; Mariani, M.; Tarani, L.; Bedeschi, M. F.; Milani, D.; Melis, D.; Bartuli, A.; Cubellis, M. V.; Selicorni, A.; Cirillo Silengo, M.; Larizza, L.; Riccio, A.; Ferrero, G. B. (Epi)Genotype-Phenotype Correlations in Beckwith-Wiedemann Syndrome. *Eur. J. Hum. Genet.* **2016**, *24* (2), 183–190. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.88>.
- (95) Gabory, A.; Ripoché, M. A.; Yoshimizu, T.; Dandolo, L. The H19 Gene: Regulation and Function of a Non-Coding RNA. *Cytogenet. Genome Res.* **2006**, *113* (1–4), 188–193. <https://doi.org/10.1159/000090831>.
- (96) Weber, M.; Milligan, L.; Delalbre, A.; Antoine, E.; Brunel, C.; Cathala, G.; Forné, T. Extensive Tissue-Specific Variation of Allelic Methylation in the Igf2 Gene during Mouse Fetal Development: Relation to Expression and Imprinting. *Mech. Dev.* **2001**, *101* (1–2), 133–141. [https://doi.org/10.1016/S0925-4773\(00\)00573-6](https://doi.org/10.1016/S0925-4773(00)00573-6).
- (97) Bhan, A.; Soleimani, M.; Mandal, S. S. Long Noncoding RNA and Cancer: A New Paradigm. *Cancer Res.* **2017**, *77* (15), 3965–3981. <https://doi.org/10.1158/0008-5472.CAN-16-2634>.
- (98) Tinzl, M.; Marberger, M.; Horvath, S.; Chypre, C. DD3PCA3 RNA Analysis in Urine - A New Perspective for Detecting Prostate Cancer. *Eur. Urol.* **2004**, *46* (2), 182–187. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2004.06.004>.
- (99) Shi, T.; Gao, G.; Cao, Y. Long Noncoding RNAs as Novel Biomarkers Have a Promising Future in Cancer Diagnostics. *Dis. Markers* **2016**, *2016*. <https://doi.org/10.1155/2016/9085195>.
- (100) Crea, F.; Watahiki, A.; Quagliata, L.; Xue, H.; Pikor, L.; Parolia, A.; Wang, Y.; Lin, D.; Lam, W. L.; Farrar, W. L.; Isogai, T.; Morant, R.; Castori-Eppenberger, S.; Chi, K. N.; Wang, Y.; Helgason, C. D. Identification of a Long Non-Coding RNA as a Novel Biomarker and Potential Therapeutic Target for Metastatic Prostate Cancer. *Oncotarget*

- 2014**, 5 (3), 764–774. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.1769>.
- (101) Wang, K.; Guo, W. X.; Li, N.; Gao, C. F.; Shi, J.; Tang, Y. F.; Shen, F.; Wu, M. C.; Liu, S. R.; Cheng, S. Q. Serum LncRNAs Profiles Serve as Novel Potential Biomarkers for the Diagnosis of HBV-Positive Hepatocellular Carcinoma. *PLoS One* **2015**, 10 (12), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0144934>.
- (102) Balik, V.; Srovnal, J.; Sulla, I.; Kalita, O.; Foltanova, T.; Vaverka, M.; Hrabalek, L.; Hajduch, M. MEG3: A Novel Long Noncoding Potentially Tumour-Suppressing RNA in Meningiomas. *J. Neurooncol.* **2013**, 112 (1), 1–8. <https://doi.org/10.1007/s11060-012-1038-6>.
- (103) Schuster-Gossler, K.; Bilinski, P.; Sado, T.; Ferguson-Smith, A.; Gossler, A. The Mouse Gtl2 Gene Is Differentially Expressed during Embryonic Development, Encodes Multiple Alternatively Spliced Transcripts, and May Act as an RNA. *Dev. Dyn.* **1998**, 212 (2), 214–228. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0177\(199806\)212:2<214::AID-AJA6>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0177(199806)212:2<214::AID-AJA6>3.0.CO;2-K).
- (104) Benetatos, L.; Dasoula, A.; Hatzimichael, E.; Georgiou, I.; Syrrou, M.; Bourantas, K. L. Promoter Hypermethylation of the MEG3 (DLK1/MEG3) Imprinted Gene in Multiple Myeloma. *Clin. Lymphoma Myeloma* **2008**, 8 (3), 171–175. <https://doi.org/10.3816/CLM.2008.n.021>.
- (105) Murphy, S. K.; Wylie, A. A.; Coveler, K. J.; Cotter, P. D.; Papenhausen, P. R.; Sutton, V. R.; Shaffer, L. G.; Jirtle, R. L. Epigenetic Detection of Human Chromosome 14 Uniparental Disomy. *Hum. Mutat.* **2003**, 22 (1), 92–97. <https://doi.org/10.1002/humu.10237>.
- (106) Zhang, X.; Rice, K.; Wang, Y.; Chen, W.; Zhong, Y.; Nakayama, Y.; Zhou, Y.; Klibanski, A. Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Noncoding Ribonucleic Acid: Isoform Structure, Expression, and Functions. *Endocrinology* **2010**, 151 (3), 939–947. <https://doi.org/10.1210/en.2009-0657>.
- (107) Al-Rugeebah, A.; Alanazi, M.; Parine, N. R. MEG3: An Oncogenic Long Non-Coding RNA in Different Cancers. *Pathol. Oncol. Res.* **2019**, 25 (3), 859–874. <https://doi.org/10.1007/s12253-019-00614-3>.
- (108) Gejman, R.; Batista, D. L.; Zhong, Y.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Swearingen, B.; Stratakis, C. A.; Hedley-Whyte, E. T.; Klibanski, A. Selective Loss of MEG3 Expression and

- Intergenic Differentially Methylated Region Hypermethylation in the MEG3/DLK1 Locus in Human Clinically Nonfunctioning Pituitary Adenomas. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2008**, *93* (10), 4119–4125. <https://doi.org/10.1210/jc.2007-2633>.
- (109) Qu, C.; Jiang, T.; Li, Y.; Wang, X.; Cao, H.; Xu, H.; Qu, J.; Chen, J. G. Gene Expression and IG-DMR Hypomethylation of Maternally Expressed Gene 3 in Developing Corticospinal Neurons. *Gene Expr. Patterns* **2013**, *13* (1–2), 51–56. <https://doi.org/10.1016/j.gep.2012.11.003>.
- (110) Zhou Yunli, Zhang Xun, K. A. MEG3 Noncoding RNA: A Tumor Suppressor. *J. Mol. Endocrinol.* **2013**, *48* (3). <https://doi.org/10.1530/JME-12-0008.MEG3>.
- (111) Tan, J.; Hou, Y. C.; Fu, L. N.; Wang, Y. Q.; Liu, Q. Q.; Xiong, H.; Chen, Y. X.; Fang, J. Y. Long Noncoding RNA CCAT2 as a Potential Novel Biomarker to Predict the Clinical Outcome of Cancer Patients: A Meta-Analysis. *J. Cancer* **2017**, *8* (8), 1498–1506. <https://doi.org/10.7150/JCA.18626>.
- (112) Wilkins, J. F. Genomic Imprinting and Methylation: Epigenetic Canalization and Conflict. *Trends Genet.* **2005**, *21* (6), 356–365. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2005.04.005>.
- (113) Herman, J. G.; Baylin, S. B. Gene Silencing in Cancer in Association with Promoter Hypermethylation. *N. Engl. J. Med.* **2003**, *349* (21), 2042–2054. <https://doi.org/10.1056/NEJMra023075>.
- (114) Astuti, D.; Latif, F.; Wagner, K.; Gentle, D.; Cooper, W. N.; Catchpoole, D.; Grundy, R.; Ferguson-Smith, A. C.; Maher, E. R. Epigenetic Alteration at the DLK1-GTL2 Imprinted Domain in Human Neoplasia: Analysis of Neuroblastoma, Pheochromocytoma and Wilms' Tumour. *Br. J. Cancer* **2005**, *92* (8), 1574–1580. <https://doi.org/10.1038/sj.bjc.6602478>.
- (115) Zhao, J.; Dahle, D.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Klibanski, A. Hypermethylation of the Promoter Region Is Associated with the Loss of MEG3 Gene Expression in Human Pituitary Tumors. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **2005**, *90* (4), 2179–2186. <https://doi.org/10.1210/jc.2004-1848>.
- (116) Benetatos, L.; Hatzimichael, E.; Dasoula, A.; Dranitsaris, G.; Tsiara, S.; Syrrou, M.; Georgiou, I.; Bourantas, K. L. CpG Methylation Analysis of the MEG3 and SNRPN Imprinted Genes in Acute Myeloid Leukemia and Myelodysplastic Syndromes. *Leuk.*

- Res.* **2010**, *34* (2), 148–153. <https://doi.org/10.1016/j.leukres.2009.06.019>.
- (117) Vogelstein, B.; Lane, D.; Levine, A. J. Surfing the P53 Network : Article : Nature. *Nature* **2000**, *408* (6810), 307–310. <https://doi.org/10.1038/35042675>.
- (118) Joachim, T.; Ram, Z.; Rappaport, Z. H.; Simon, M.; Schramm, J.; Wiestler, O. D.; Von Deimling, A. Comparative Analysis of the NF2, TP53, PTEN, KRAS, NRAS and HRAS Genes in Sporadic and Radiation-Induced Human Meningiomas. *Int. J. Cancer* **2001**, *94* (2), 218–221. <https://doi.org/10.1002/ijc.1467>.
- (119) Brooks, C. L.; Gu, W. Ubiquitination, Phosphorylation and Acetylation: The Molecular Basis for P53 Regulation. *Curr. Opin. Cell Biol.* **2003**, *15* (2), 164–171. [https://doi.org/10.1016/S0955-0674\(03\)00003-6](https://doi.org/10.1016/S0955-0674(03)00003-6).
- (120) He, Y.; Luo, Y.; Liang, B.; Ye, L.; Lu, G.; He, W. Potential Applications of MEG3 in Cancer Diagnosis and Prognosis. *Oncotarget* **2017**, *8* (42), 73282–73295. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.19931>.
- (121) Zhu, J.; Liu, S.; Ye, F.; Shen, Y.; Tie, Y.; Zhu, J.; Wei, L.; Jin, Y.; Fu, H.; Wu, Y.; Zheng, X. Long Noncoding RNA MEG3 Interacts with P53 Protein and Regulates Partial P53 Target Genes in Hepatoma Cells. *PLoS One* **2015**, *10* (10), 1–15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0139790>.
- (122) Bootcov, M. R.; Bauskin, A. R.; Valenzuela, S. M.; Moore, A. G.; Bansal, M.; He, X. Y.; Zhang, H. P.; Donnellan, M.; Mahler, S.; Pryor, K.; Walsh, B. J.; Nicholson, R. C.; Fairlie, W. D.; Por, S. B.; Robbins, J. M.; Breit, S. N. MIC-1, a Novel Macrophage Inhibitory Cytokine, Is a Divergent Member of the TGF- β Superfamily. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **1997**, *94* (21), 11514–11519. <https://doi.org/10.1073/pnas.94.21.11514>.
- (123) Albertoni, M.; Shaw, P. H.; Nozaki, M.; Sophie, G.; Tenan, M.; Hamou, M. F.; Fairlie, D. W.; Breit, S. N.; Paralkar, V. M.; De Tribolet, N.; Van Meir, E. G.; Hegi, M. E. Anoxia Induces Macrophage Inhibitory Cytokine-1 (MIC-1) in Glioblastoma Cells Independently of P53 and HIF-1. *Oncogene* **2002**, *21* (27), 4212–4219. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1205610>.
- (124) Lyu, Y.; Lou, J.; Yang, Y.; Feng, J.; Hao, Y.; Huang, S.; Yin, L.; Xu, J.; Huang, D.; Ma, B.; Zou, D.; Wang, Y.; Zhang, Y.; Zhang, B.; Chen, P.; Yu, K.; Lam, E. W. F.; Wang, X.; Liu, Q.; Yan, J.; Jin, B. Dysfunction of the WT1-MEG3 Signaling Promotes

- AML Leukemogenesis via P53-Dependent and -Independent Pathways. *Leukemia* **2017**, *31* (12), 2543–2551. <https://doi.org/10.1038/leu.2017.116>.
- (125) Xing, E. P.; Yang, G. Y.; Wang, L. D.; Shi, S. T.; Yang, C. S. Loss of Heterozygosity of the Rb Gene Correlates with PRb Protein Expression and Associates with P53 Alteration in Human Esophageal Cancer. *Clin. Cancer Res.* **1999**, *5* (5), 1231–1240.
- (126) Jacks, T.; Weinberg, R. A. The Eirpantiing Role of Cell Cycle Regulators Landscaping the Cancer Terrain.
- (127) Lundberg, A. S.; Weinberg, R. A. Functional Inactivation of the Retinoblastoma Protein Requires Sequential Modification by at Least Two Distinct Cyclin-Cdk Complexes. *Mol. Cell. Biol.* **1998**, *18* (2), 753–761. <https://doi.org/10.1128/mcb.18.2.753>.
- (128) Weinberg, R. A. The Retinoblastoma Protein and Cell Cycle Control. *Cell* **1995**, *81* (3), 323–330. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(95\)90385-2](https://doi.org/10.1016/0092-8674(95)90385-2).
- (129) Kruer, T. L.; Dougherty, S. M.; Reynolds, L.; Long, E.; De Silva, T.; Lockwood, W. W.; Clem, B. F. Expression of the LncRNA Maternally Expressed Gene 3 (MEG3) Contributes to the Control of Lung Cancer Cell Proliferation by the Rb Pathway. *PLoS One* **2016**, *11* (11), 1–17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0166363>.
- (130) Sherr, C. J. Cancer Cell Cycles. *Science* (80-.). **1996**, *274* (5293), 1672–1674. <https://doi.org/10.1126/science.274.5293.1672>.
- (131) Simon, M.; Park, T.; K, G.; Mahlberg, R.; Hackenbroch, M.; Bostr, J.; L, T. Alterations of INK4ap16–P14ARF/INK4bp15 Expression and Telomerase Activation in Meningioma Progression. *J. Neurooncol.* **2001**, *55* (3), 149–158. <https://doi.org/10.1023/a:1013863630293>.
- (132) Mathivanan, J.; Rohini, K.; Gope, M. L.; Anandh, B.; Gope, R. Altered Structure and Deregulated Expression of the Tumor Suppressor Gene Retinoblastoma (RB1) in Human Brain Tumors. *Mol. Cell. Biochem.* **2007**, *302* (1–2), 67–77. <https://doi.org/10.1007/s11010-007-9428-3>.
- (133) Ma, D.; Zhou, P.; Harbour, J. W. Distinct Mechanisms for Regulating the Tumor Suppressor and Antiapoptotic Functions of Rb. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278* (21), 19358–19366. <https://doi.org/10.1074/jbc.M301761200>.

- (134) Rassidakis, G. Z.; Lai, R.; Herling, M.; Cromwell, C.; Schmitt-Graeff, A.; Medeiros, L. J. Retinoblastoma Protein Is Frequently Absent or Phosphorylated in Anaplastic Large-Cell Lymphoma. *Am. J. Pathol.* **2004**, *164* (6), 2259–2267.
[https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63782-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63782-0).
- (135) Uroda, T.; Anastasakou, E.; Rossi, A.; Teulon, J. M.; Pellequer, J. L.; Annibale, P.; Pessey, O.; Inga, A.; Chillón, I.; Marcia, M. Conserved Pseudoknots in LncRNA MEG3 Are Essential for Stimulation of the P53 Pathway. *Mol. Cell* **2019**, *75* (5), 982–995.e9. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.025>.
- (136) Chunharojrith, P.; Nakayama, Y.; Jiang, X.; Kery, R. E.; Ma, J.; De La Hoz Ulloa, C. S.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Klibanski, A. Tumor Suppression by MEG3 LncRNA in a Human Pituitary Tumor Derived Cell Line. *Mol. Cell. Endocrinol.* **2015**, *416*, 27–35.
<https://doi.org/10.1016/j.mce.2015.08.018>.
- (137) Stork, P. J. S.; Schmitt, J. M. Crosstalk between CAMP and MAP Kinase Signaling in the Regulation of Cell Proliferation. *Trends Cell Biol.* **2002**, *12* (6), 258–266.
[https://doi.org/10.1016/S0962-8924\(02\)02294-8](https://doi.org/10.1016/S0962-8924(02)02294-8).
- (138) Zhao, J.; Zhang, X.; Zhou, Y.; Ansell, P. J.; Klibanski, A. Cyclic AMP Stimulates MEG3 Gene Expression in Cells through a CAMP-Response Element (CRE) in the MEG3 Proximal Promoter Region. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2006**, *38* (10), 1808–1820. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2006.05.004>.
- (139) Benetatos, L.; Vartholomatos, G.; Hatzimichael, E. MEG3 Imprinted Gene Contribution in Tumorigenesis. *Int. J. Cancer* **2011**, *779*, 773–779.
<https://doi.org/10.1002/ijc.26052>.
- (140) Gordon, F. E.; Nutt, C. L.; Cheunschon, P.; Nakayama, Y.; Provencher, K. A.; Rice, K. A.; Zhou, Y.; Zhang, X.; Klibanski, A. Increased Expression of Angiogenic Genes in the Brains of Mouse Meg3-Null Embryos. *Endocrinology* **2010**, *151* (6), 2443–2452.
<https://doi.org/10.1210/en.2009-1151>.
- (141) Zhou, Y.; Zhang, X.; Klibanski, A. MEG3 Noncoding RNA: A Tumor Suppressor. *J. Mol. Endocrinol.* **2012**, *48* (3), 45–53. <https://doi.org/10.1530/JME-12-0008>.
- (142) Drábek J., Berkovcová J., Džubák P., Hajdúch M., Khoylou M., Koudeláková V., Srovnal J., Staňková M., T. R. *Detekce Nádorových Biomarkerů v Molekulárně Biologické Laboratoři*, 1.; Univerzita Palackého v Olomouci, 2012.

- (143) Thermo Fisher Scientific. *User Manual ViewRNA™ ISH Tissue 1-Plex Assay*; 2014.
- (144) Espada, J.; Horobin, R. W.; Stockert, J. C. Fluorescent Cytochemistry of Acid Phosphatase and Demonstration of Fluid-Phase Endocytosis Using an Azo Dye Method. *Histochem. Cell Biol.* **1997**, *108* (6), 481–487.
<https://doi.org/10.1007/s004180050188>.
- (145) Wikiskripta. Konfokální mikroskop [online]. 2018 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Konfokální_mikroskop/.
- (146) Wikiskripta. Fluorescenční mikroskop [online]. 2016 [cit. 2020-05-03]. Dostupné z: https://www.wikiskripta.eu/w/Fluorescenční_mikroskop/.
- (147) Puchtler, H.; Meloan, S. N. On the Chemistry of Formaldehyde Fixation and Its Effects on Immunohistochemical Reactions. *Histochemistry* **1985**, *82* (3), 201–204.
<https://doi.org/10.1007/BF00501395>.
- (148) Tripathi, M. K.; Zacheaus, C.; Doxtater, K.; Keramatnia, F.; Gao, C.; Yallapu, M. M.; Jaggi, M.; Chauhan, S. C. Z Probe, an Efficient Tool for Characterizing Long Non-Coding RNA in FFPE Tissues. *Non-coding RNA* **2018**, *4* (3), 1–10.
<https://doi.org/10.3390/ncrna4030020>.
- (149) Leucci, E.; Coe, E. A.; Marine, J. C.; Vance, K. W. The Emerging Role of Long Non-Coding RNAs in Cutaneous Melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* **2016**, *29* (6), 619–626. <https://doi.org/10.1111/pcmr.12537>.
- (150) Dunagin, M.; Cabili, M. N.; Rinn, J.; Raj, A. Nuclear Bodies and Noncoding RNAs. *Methods Mol. Biol.* **2015**, *1262*, 3–19. <https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2253-6>.
- (151) Cabili, M. N.; Dunagin, M. C.; McClanahan, P. D.; Bjaesch, A.; Padovan-Merhar, O.; Regev, A.; Rinn, J. L.; Raj, A. Localization and Abundance Analysis of Human LncRNAs at Single-Cell and Single-Molecule Resolution. *Genome Biol.* **2015**, *16* (1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0586-4>.