



**Charakterystyka wybranych kolistych RNA w glejaku
wielopostaciowym - biogeneza kolistych RNA i ich potencjalne
funkcje**

Mgr Julia Latowska-Łysiak

Promotor: dr hab. Katarzyna Rolle, Prof. ICHB PAN

Zakład Neuroonkologii Molekularnej

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

Poznań, 2024

Składam serdeczne podziękowania

Pani dr hab. Katarzynie Rolle, prof. ICHB PAN za przekazaną wiedzę, wsparcie i zaufanie, którym mnie obdarzyła, inspirujące rozmowy i nieocenioną pomoc.

Całemu zespołowi Zakładu Neuroonkologii Molekularnej

dr Julii Misiorek,

dr Dariuszowi Wawrzyniakowi,

dr inż. Pawłowi Głodowiczowi,

dr Konradowi Kuczyńskiemu

Za udzielone rady oraz przyjacielską i ciepłą atmosferę, dzięki której każdy dzień był wyjątkowy.

mgr Adrianie Grabowskiej,

Za wszystkie lata spędzone razem na studiach licencjackich, magisterskich i doktoranckich, które zaowocowały nie tylko wspaniałą przyjaźnią, ale też ogromem radości, sukcesów i wspólnych wspomnień.

dr Małgorzacie Grabowskiej

dr Żanecie Zarębskiej

Za wsparcie merytoryczne, praktyczne i duchowe, oraz za ich bezcenną przyjaźń.

Panu prof. dr hab. Janowi Barciszewskiemu

dr Marcinowi Sajkowi,

dr Łukaszowi Przybyłowi,

mgr Dorocie Wronce

mgr Annie Karlik

pani Małgorzacie Dąbkiewicz,

dziękuję za przyczynienie się do mojego rozwoju w trakcie trwania doktoratu, pomocne wskazówki i okazaną życzliwość.

Prof. Karolowi Latowskiemu, który zaszczepił we mnie miłość do Biologii oraz był nie tylko wybitnym naukowcem, ale też najwspanialszym Dziadkiem.

Babci Bogumile Latowskiej, która była moją opoką, motywacją i najlepszą Przyjaciółką.

Mateuszowi, najwspanialszemu Mężowi, który zawsze wspiera mnie we wszystkich moich marzeniach i celach oraz jest dla mnie wzorem, za którym podążam.

Oli za to, że jest zawsze wtedy, gdy jej potrzebuję.

Dla Rodziców i dzięki Nim

Niniejsza rozprawa doktorska powstała w efekcie realizacji projektu badawczego Sonata Bis o numerze 2017/26/E/NZ3/01004 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Przeprowadzone badania uzyskały zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu o numerze 534/18.

Spis treści

Wykaz prac naukowych	9
Lista skrótów	10
Streszczenie	14
Abstract	16
1. Wprowadzenie	18
1.1. Nowotwory centralnego układu nerwowego	18
1.2. Glejak wielopostaciowy	18
1.2.1. Epidemiologia i klasyfikacja	18
1.2.2. Diagnostyka oraz leczenie	21
1.2.3. Charakterystyka molekularna GBM	23
1.2.3.1. Klasyfikacje molekularne GBM	25
1.2.3.2. Komórki macierzyste glejaka	26
1.2.3.3. Przejście nabłonkowo-mezenchymalne	26
1.2.3.4. Mikrośrodowisko guza – macierz zewnątrzkomórkowa i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe	27
1.3. Kolisty RNA	29
1.3.1. Historia i klasyfikacja kolistych RNA	31
1.3.2. Biogeneza kolistych RNA	31
1.3.3. Degradacja kolistych RNA	34
1.3.4. Funkcje kolistych RNA	35
1.3.4.1. Oddziaływanie z miRNA	35
1.3.4.2. Oddziaływanie z RBP	36
1.3.4.3. Uleganie translacji	38
1.3.5. Profil ekspresji kolistych RNA	40
1.3.6. Kolisty RNA w nowotworach	42
1.3.6.1. Kolisty RNA w GBM	45
2. Materiały i metody	49
2.1. Ważniejsze odczynniki chemiczne oraz gotowe zestawy odczynników	49
2.2. Bufory i pożywki wykorzystane w pracy	50
2.3. Oligonukleotydy	52
2.4. Hodowle komórkowe	53

2.4.1. Linie komórkowe	53
2.4.2. Kultury <i>in vitro</i>	53
2.4.3. Sfery	54
2.5. Tkanki glejaka pobrane od pacjentów oraz próbki zdrowego mózgu	54
2.6. Sekwencjonowanie RNA tkanek GBM oraz różnicowa analiza ekspresji circRNA	56
2.6.1. Różnicowa analiza ekspresji transkryptów białek wiążących RNA	56
2.6.2. Korelacja poziomu ekspresji transkryptów białek wiążących RNA i kolistych RNA posiadających potencjalne miejsca wiązania	57
2.6.3. Stratyfikacja prób GBM w oparciu o ekspresję białek wiążących RNA	57
2.7. Izolacja całkowitego RNA oraz DNazowanie	57
2.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	58
2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji	58
2.10. Reakcja poliadenylacji oraz micro-RT	59
2.11. Trawienie całkowitego RNA rybonukleazą R i łańcuchowa reakcja polimerazy	59
2.12. Frakcjonowanie	60
2.13. Transfekcja za pomocą siRNA	61
2.14. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym	62
2.15. Test zablźniania rany	63
2.16. Test formowania sfery	64
2.17. Monitorowanie tempa migracji	64
2.18. Analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym	64
2.19. Indukcja przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego za pomocą TGF β	65
2.20. Indukcja hipoksji	65
2.21. Przygotowanie konstruktów do podwyższenia poziomu ekspresji kolistej formy ATXN10 i FAM188A w liniach komórkowych	65
2.22. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego	66

2.23. PCR kolonijny	67
2.24. Izolacja plazmidów w dużej skali	67
2.25. Transfekcja komórek plazmidem	67
2.26. Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera	68
2.27. Analiza western blot	68
2.28. Immunoprecypitacja białka AGO2	69
2.29. Eksperyment typu „pulldown”	70
2.30. Przygotowanie próbek do spektrometrii mas	71
2.31. Spektrometria mas	72
2.32. Sekwencjonowanie RNA próbek po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10	72
2.33. Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z pożywki hodowlanej	73
2.34. Analiza statystyczna	73
3. Cel pracy	74
4. Wyniki	75
4.1. Sekwencjonowanie RNA	75
4.1.1. Określenie profilu ekspresji kolistych RNA w GBM	75
4.1.2. Walidacja wyników wybranych kandydatów kolistych RNA o obniżonym poziomie ekspresji	78
4.1.3. Analiza profilu ekspresji transkryptów białek wiążących RNA w glejaku wielopostaciowym	84
4.1.4. Analiza korelacji poziomu ekspresji kolistych RNA oraz białek wiążących RNA z uwzględnieniem potencjalnych miejsc wiązania	85
4.1.5. Nowe podtypy oparte o profil ekspresji białek wiążących RNA	89
4.2. Charakterystyka wybranych kolistych RNA	90
4.2.1. Analiza poziomu ekspresji kolistej i liniowej formy AXTN10 oraz FAM188A w wybranych liniach komórkowych oraz sferach	92
4.2.2. Określenie lokalizacji subkomórkowej wybranych kolistych RNA	95

4.3. Charakterystyka circATXN10	97
4.3.1. Obniżenie poziomu ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10 za pomocą siRNA	97
4.3.1.1. Badanie tempa migracji komórek za pomocą testu zarastania rany	102
4.3.1.2. Badanie tempa migracji komórek za pomocą systemu xCELLigence	104
4.3.1.3. Badanie tempa inwazji za pomocą testu formowania sfer	105
4.3.1.4. Określenie poziomu ekspresji markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego	107
4.3.1.5. Określenie poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po indukcji TGF β	108
4.3.1.6. Badanie przebiegu cyklu komórkowego	109
4.3.2. Podwyższenie poziomu ekspresji kolistej formy ATXN10 za pomocą wektora	110
4.3.3. Identyfikacja cząsteczek wchodzących w interakcję z kolistą i liniową formą ATXN10 za pomocą eksperymentu typu „pulldown”	112
4.3.4. Określenie profilu ekspresji po obniżeniu poziomu kolistego i liniowego transkryptu ATXN10 za pomocą sekwencjonowania RNA	117
4.4. Charakterystyka circFAM188A	122
4.4.1. Identyfikacja miRNA posiadających miejsca wiązania z circFAM188A	122
4.4.1.1. Potwierdzenie wiązania cząsteczek miRNA przez circFAM188A za pomocą immunoprecypitacji białka AGO2	122
4.4.1.2. Określenie poziomu miR-1238 i miR-576 w tkankach GBM	123
4.4.1.3. Obniżenie poziomu ekspresji formy kolistej i liniowej FAM188A za pomocą siRNA	124
4.4.1.4. Podwyższenie poziomu ekspresji kolistej formy	126

FAM188A za pomocą wektora	
4.4.1.5. Wpływ środowiska hipoksyjnego na poziom ekspresji circFAM188A i miR-1238	128
4.4.1.6. Wpływ środowiska hipoksyjnego na poziom ekspresji circFAM188A i miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych	129
4.4.1.7. Identyfikacja interakcji circFAM18A i miR-1238 za pomocą eksperymentu typu „pulldown”	131
4.4.1.8. Określenie transkryptów z miejscami wiązania dla miR-1238	132
4.5. Określenie wpływu białek wiążących RNA na ekspresję wybranych circRNA	134
4.5.1. Identyfikacja miejsc wiązania RBP i wybranych kolistych RNA	134
4.5.2. Określenie poziomu ekspresji transkryptów FUS i EIF4A3 w guzach GBM	137
4.5.3. Badanie poziomu ekspresji wybranych kolistych RNA w komórkach glejaka z delecją genu <i>fus</i>	137
4.5.4. Poziom wybranych kolistych RNA w komórkach GBM ze zwiększonym poziomem białka FUS	138
5. Dyskusja	142
5.1. Profil ekspresji kolistych RNA w GBM	142
5.2. Profil ekspresji transkryptów RBP w GBM	144
5.2.1. Potencjalne interakcje kolistych RNA i białek wiążących RNA w GBM	144
5.2.2. Białka wiążące RNA, a podtypy molekularne GBM	146
5.3. Rola wybranych kolistych RNA w GBM	147
5.3.1. CircATXN10	148
5.3.2. CircFAM188A	155
5.4. Wpływ RBP na biogenezę wybranych kolistych RNA	157
6. Wnioski i perspektywy	159
7. Bibliografia	161

Wykaz prac naukowych

- **Latowska J***, Grabowska A*, Zarebska Ż., Kuczyński K., Kuczyńska B., & Rolle K. (2020). Non-coding RNAs in Brain Tumors, the Contribution of lncRNAs, circRNAs, and snoRNAs to Cancer Development-Their Diagnostic and Therapeutic Potential. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(19), 7001. IF2020 = 5.924; MEiN = 140
- Tymoniuk B, Zmora P, **Latowska J**, Grabowska A, Ciesiołka A, Joachimiak P, Figura G, Borowiec M, Rolle K, Handschuh L, Fiszer A. Genetic tests based on the RT-PCR reaction in the diagnostics of SARS-CoV-2 infection. *Przegl Epidemiol.* 2021;75(1):14-26. doi: 10.32394/pe.75.02. PMID: 34328283.

Prezentowana rozprawa jest częścią trzech manuskryptów eksperymentalnych przesłanych do recenzji.

- **Latowska-Łysiak J.**, * Zarebska Ż., * Sajek MP., * Grabowska A., Buratin A., Misiorek JO., Kuczyński K., Bortoluzzi S., Żywicki M., Kosiński J., Rybak-Wolf A., Piestrzeniewicz R., Barciszewska AM., Rajewsky N., Rolle K. Transcriptome-wide analysis of circRNA-RBP interplay and their clinical significance in glioblastoma.
- Zarebska Ż*, Kuczyński K*, **Latowska-Łysiak J.**, Grabowska A., Sajek MP., Piestrzeniewicz R., Barciszewska AM, Andrzejewska B, Rolle K. Circular RNA circCLIP2 promotes the invasive properties of glioblastoma by acting as a mediator of the EMT pathway and cancer stemness.
- **Latowska-Łysiak J.**, Di Timoteo G., Grabowska A., Glogovitis I., Gaffo E., Bortoluzzi S., Serwa R. Stadnik D., Zarebska Ż., Kuczyński K., Sajek M., Rolle K. Tangled fates: exploring the interplay of ATXN10 circular and linear transcripts and their impact on glioblastoma development.

Lista skrótów

ADAR	ang. <i>Double-stranded RNA-specific adenosine deaminase</i>
Ago2	ang. <i>Argonaute-2</i>
AMPK	kinaza białkowa aktywowana przez AMP (ang. <i>AMP-activated protein kinase</i>)
APS	nadsiarczan amonu
ASO	Oligonukleotydy antysensowne (ang. <i>Antisense oligonucleotides</i>)
ATP	trifosforan adenozyiny (ang. <i>Adenosine triphosphate</i>)
ATP5B	ang. <i>ATP synthase F1 subunit beta</i>
ATRX	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>Alpha thalassemia/mental retardation syndrome X-linked</i>)
AURKA	ang. <i>Aurora kinase A</i>
BBB	bariera-krew mózg (ang. <i>Blood-brain barrier</i>)
BSJ	miejsce wiązania 5' i 3' w kolistych RNA (ang. <i>Back-splice junction site</i>)
CAF	fibroblasty związane z nowotworem (ang. <i>Cancer associated fibroblast</i>)
CDK2	kinaza cyklino-zależna 2 (ang. <i>Cyclin dependent kinase 2</i>)
cDNA	komplementarny DNA (ang. <i>Complementary DNA</i>)
CDR1as	ang. <i>CDR1 antisense RNA</i>
circRNA	koliste RNA (ang. <i>Circular RNA</i>)
CSC	nowotworowe komórki macierzyste (ang. <i>Cancer stem cell</i>)
CSCD	ang. <i>Cancer-specific circRNA database</i>
CXCR4	ang. <i>C-X-C chemokine receptor type 4</i>
DCC	(ang. <i>Deleted in colorectal carcinoma</i>),
DNA	kwas deoksyrybonukleinowy (ang. <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNMT3a	ang. <i>DNA methyltransferase 3 alpha</i>
DTT	ditiotretol
eCLIP	ang. <i>Enhanced cross-linking immunoprecipitation</i>
ECM	macierz zewnątrzkomórkowa (ang. <i>Extracellular matrix</i>)
EDTA	kwas wersenowy
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>Epidermal growth factor receptor</i>)
eIF4A3	eukariotyczny czynnik inicjacji ang. <i>eukaryotic initiation factor 4A3</i>

EMT	przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. <i>Epithelial-to-mesenchymal transition</i>)
EV	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. <i>Extracellular vesicles</i>)
FBS	płodowa surowica bydłęca
FGFR	czynnik wzrostu fibroblastów (ang. <i>Fibroblast growth factor receptor</i>)
FUS	ang. <i>Fused in sarcoma</i>
GBM	glejak wielopostaciowy (ang. <i>Glioblastoma</i>)
GSC	komórki macierzyste glejaka (ang. <i>Glioblastoma stem cell</i>)
HIF	czynnik indukowany hipoksją (ang. <i>Hypoxia inducible factor</i>)
HuR	ang. <i>Human antigen R</i>
IDH1	dehydrogenaza izocytrynianianowa 1 (ang. <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>)
IDH2	dehydrogenaza izocytrynianianowa 2 (ang. <i>Isocitrate dehydrogenase 1</i>)
IGFBP	białko wiążące insulinopodobny czynnik wzrostu (ang. <i>Insulin-like growth factor mRNA-binding protein</i>)
IL	interleukina (ang. <i>Interleukin</i>)
IRES	wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. <i>Internal ribosome entry site</i>)
KPNB1	ang. Karyopherin Subunit Beta 1
LGG	glejak o niskim stopniu złośliwości (ang. <i>Low-grade glioma</i>)
lncRNA	długie niekodujące RNA (ang. <i>Long non-coding RNA</i>)
m6A	metylacja N6-adenozyny (ang. <i>N6-Methyladenosine</i>)
MDM2	ang. <i>Mouse Double Minute 2 Homolog</i>
MgCl₂	chlorek magnezu
MGMT	metylotransferaza O6-metyloguaniny (ang. <i>O6-alkylguanine DNA alkyltransferase</i>)
miRNA	mikroRNA (ang. <i>MicroRNA</i>)
MMP	metaloproteinaza (ang. <i>Metalloproteinase</i>)
MR	rezonans magnetyczny (ang. <i>Magnetic resonance</i>)
mRNA	informacyjny RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
NaCl	chlorek sodu
ncRNA	niekodujące RNA (ang. <i>Non-coding RNA</i>)

NEDD4L	ang. <i>Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like</i>
NK	ang. <i>Natural killer</i>
NRAS	ang. <i>Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog</i>
ORF	otwarta ramka odczytu (ang. <i>Open reading frame</i>)
OS	czas przeżycia całkowitego (ang. <i>Overall survival</i>)
OUN	ośrodkowy układ nerwowy (ang. <i>Central nervous system</i>)
PCR	reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Polymerase chain reaction</i>)
PD-1	receptor programowanej śmierci 1 (ang. <i>Programmed death receptor 1</i>)
PTBP1	ang. <i>Polypyrimidine tract-binding protein 1</i>
PTEN	ang. <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>Quantitative polymerase chain reaction</i>)
RBNS	ang. RNA Bind-n-Seq
RBP	białko wiążące RNA (ang. <i>RNA-binding proteins</i>)
Rcf	względna siła odśrodkowa (ang. <i>Relative centrifugal force</i>)
RIN	wartość integralności RNA (ang. <i>RNA Integrity Number</i>)
RNA	kwas rybonukleinowy (ang. <i>Ribonucleic Acid</i>)
RNAza R	rybonukleaza R (ang. <i>Ribonuclease R</i>)
Rpm	obroty na minutę (ang. <i>Revolutions per minute</i>)
rRNA	rybosomalny RNA (ang. <i>Ribosomal RNA</i>)
RT	odwrotna transkrypcja (ang. <i>Reverse transcription</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu
siRNA	mały interferujący RNA (ang. <i>small interfering RNA</i>)
SRSF	ang. <i>Serine/arginine-rich splicing factor</i>
STAT3	ang. <i>Signal transducer and activator of transcription 3</i>
TAM	makrofagi związane z nowotworem (ang. <i>Tumor-Associated Macrophages</i>)
TCGA	ang. <i>The Cancer Genome Atlas</i>
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TK	tomografia komputerowa (ang. <i>Computed Tomography</i>)
TMZ	temozolomid (ang. <i>Temozolomide</i>)

TNF	czynnik martwicy nowotworu (ang. <i>Tumor necrosis factor</i>)
Tris	hydroksymetyloaminometan
tRNA	transportujący RNA (ang. <i>Transfer RNA</i>)
TSCD	ang. <i>Tissue-Specific circRNA database</i>
U1 snRNP	ang. <i>U1 small nuclear ribonucleoprotein particle</i>
USP28	ang. <i>Ubiquitin specific peptidase 28</i>
VEGFA	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego A (ang. <i>Vascular endothelial growth factor A</i>)
VEGFR2	receptor czynnika wzrostu śródbłónka naczyniowego 2 (ang. <i>Vascular endothelial growth factor receptor 2</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organizartion</i>)
YBX1	ang. <i>Y box binding protein 1</i>
YTHDF2	ang. <i>YTH N6-methyladenosine RNA binding protein 2</i>
YY1	ang. <i>Yin Yang 1</i>

Streszczenie

Glejak wielopostaciowy (GBM) to najbardziej agresywny i śmiertelny typ guza mózgu, który mimo znacznego rozwoju medycyny nadal pozostaje nowotworem, w przypadku którego dostępne ścieżki leczenia są nieskuteczne. Spowodowane jest to wieloma czynnikami takimi jak obecność bariery krew-mózg, wysoka heterogenność molekularna w obrębie guza, ogromna agresywność i szybkie naciekanie zdrowej tkanki, a także częsty rozwój oporności komórek na chemio- i radioterapię. Procesy te są ściśle związane z obecnością komórek macierzystych glejaka, w dużej mierze odpowiedzialnych za progresję guza, a także występowaniem zjawiska nazywanego przejściem nabłonkowo-mezenchymalnym, które powoduje utratę adhezji komórek oraz wzrost ich potencjału migracyjnego. Dlatego też niezwykle ważne jest jeszcze dokładniejsze poznanie i zrozumienie podstaw molekularnych odpowiadających za rozwój GBM, co może być kluczowe w dalszym poszukiwaniu celów terapeutycznych i diagnostycznych.

GBM charakteryzuje się nieprawidłową ekspresją wielu niekodujących RNA, w tym kolistych RNA (circRNA). Kolisty RNA to klasa kowalencyjnie zamkniętych, pozbawionych końców 5' i 3' RNA, które ulegają obfitej ekspresji w mózgu, a w ostatnim czasie odkryto, że pełnią też różnorodne role związane z rozwojem i progresją nowotworów. Mogą one wpływać na różne procesy komórkowe poprzez interakcję z innymi cząsteczkami - do tej pory szeroko opisano ich oddziaływanie z microRNA, jednak wiadomo, że mogą także wpływać na białka wiążące RNA (RBP), które jednocześnie są modulatorami biogenezy circRNA. Wartość diagnostyczna circRNA i kompleksów circRNA/RBP jest nadal w dużej mierze nieznana. Dlatego też w niniejszej pracy skupiono się na porównaniu profilu ekspresji circRNA i RBP na podstawie sekwencjonowania RNA z pobranych od pacjentów guzów i próbek zdrowego mózgu. Umożliwiło to wstępne określenie relacji między tymi cząsteczkami oraz potencjalny wpływ RBP na poziom ekspresji circRNA. Wykonana analiza pozwoliła ponadto na wyselekcjonowanie kandydatów circRNA o obniżonym poziomie ekspresji.

Kolejna część pracy poświęcona została badaniu wybranych kolistych RNA – circATXN10 oraz circFAM188A, w przypadku których skupiono się na ich potencjalnej roli w procesach związanych z rozwojem GBM. Dzięki zastosowaniu szeregu testów funkcjonalnych oraz eksperymentów opartych na podejściu typu „utrata funkcji” oraz „nabycie funkcji” określono ich relację z liniowymi odpowiednikami oraz oddziaływanie z innymi cząsteczkami takimi jak białka czy miRNA, a także ustalono ich potencjalny wpływ na procesy związane z migracją oraz inwazją komórek GBM.

W ostatniej części niniejsze dysertacji skupiono się na badaniu wpływu wybranych RBP na circRNA o obniżonym poziomie ekspresji. Umożliwiło to wstępne określenie jednego z prawdopodobnych powodów zmienionego profilu ekspresji circATXN10 oraz circFAM188A w guzach GBM.

Uzyskane wyniki dostarczyły informacji o profilu ekspresji RBP oraz circRNA, co może być podstawą do dalszych badań wybranych cząsteczek w kontekście rozwoju GBM. Wykonana analiza potwierdziła wysoką heterogenność guzów GBM na poziomie molekularnym. Ponadto udowodniono udział wybranych circRNA w procesach związanych z progresją guza, a także wpływ RBP na biogenezę kolistych RNA, co dodatkowo świadczy o dalszej potrzebie badania tych cząsteczek w celu lepszego zrozumienia podłoża molekularnego tego nowotworu.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is the most aggressive and fatal type of brain tumor, which, despite the enormous development of medicine, remains a cancer with ineffective treatment methods. It is caused by multiple factors, such as the presence of the blood-brain barrier, vast molecular heterogeneity within the tumor, high aggressiveness, and rapid infiltration of healthy tissue, as well as the frequent development of cell resistance to chemotherapy and radiotherapy. These processes are closely related to the presence of glioma stem cells in the tumor, which are largely responsible for tumor progression, as well as the occurrence of a phenomenon called epithelial-mesenchymal transition, which causes the loss of cell adhesion and an increase in their migration potential. Therefore, it is essential to better understand the molecular basis responsible for the development of GBM, which may be crucial in the further search for therapeutic and diagnostic targets.

GBM is characterized by aberrant expression of multiple noncoding RNAs, including circular RNAs (circRNAs). Circular RNAs are a class of covalently closed, lacking 5'- and 3'-ends RNAs that are abundantly expressed in the brain and have recently been found to play a variety of roles in cancer development and progression. They can influence various cellular processes by interacting with other molecules - their interaction with microRNA has been widely described so far, but it is known that they can also affect RNA-binding proteins (RBPs), which are also modulators of circRNA biogenesis. The diagnostic value of circRNAs and circRNA/RBP complexes is still largely unknown. Therefore, this study focused on comparing the expression profile of circRNA and RBP based on RNA sequencing from patient tumors and healthy brain samples. This approach enabled to initially determine the relationship between these molecules and the potential impact of RBP on the level of circRNA expression. The analysis also allowed for the selection of downregulated circRNA candidates.

The next part of the work was devoted to the study of selected circular RNAs - circATXN10 and circFAM188A, with a special interest in their potential role in processes related to the development of GBM. The series of functional assays and experiments utilizing the "loss-of-function" and "gain-of-function" approaches allowed to establish their relationship with their linear counterpart and interaction with other molecules such as proteins or microRNAs, as well as their potential impact on processes related to migration and invasion of GBM cells.

The last part of this dissertation focused on studying the impact of selected RBPs on downregulated circRNAs. This allowed to initially determine one of the presumable reasons for the disrupted expression profile of circATXN10 and circFAM188A in GBM cells.

The obtained results provide information on the expression profile of RBPs and circRNAs, which may lay the foundations for further and more comprehensive studies of selected molecules in the context of GBM progression. The performed analysis confirmed the vast heterogeneity of GBM tumors at the molecular level. Moreover, the participation of selected circRNAs in processes related to tumor development, as well as the impact of RBPs on the biogenesis of circular RNAs, was proven, which additionally demonstrated the need for further study of these molecules to better understand the molecular basis of GBM.

1. Wprowadzenie

1.1. Nowotwory centralnego układu nerwowego

Pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN) to heterogenna grupa, w skład której wchodzi 100 odrębnych histologicznie typów guzów o różnej epidemiologii, histologii, charakterystyce klinicznej i odmiennych ścieżkach leczenia. Na nowotwory OUN składają się guzy pierwotne jak i wtórne (przerzutowe) – te pierwsze dzielą się na nowotwory łagodne i złośliwe, natomiast guzy wtórne powstają w wyniku przemieszczania się komórek nowotworowych z krwią lub limfą z guza pierwotnego do innego narządu, gdzie mogą dać początek guzowi przerzutowemu (nowotworami najczęściej ulegającymi przerzutom są nowotwór piersi i płuc) [1].

W ostatnim czasie Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) ogłosiła zaktualizowaną, V wersję klasyfikacji nowotworów OUN, która powstała w oparciu nie tylko o cechy histologiczne, ale również szczegółowe kryteria molekularne [2]. Bez względu na stopień złośliwości poszczególnych nowotworów OUN, stanowią one bardzo poważne zagrożenie życia, głównie ze względu na ich wpływ na wzrost ciśnienia wewnątrzczaszkowego, który związany jest ze wzrostem guza w ograniczonej przestrzeni czaszki. Mimo, iż guzy centralnego układu nerwowego nie są tak powszechne, jak inne nowotwory, nadal pozostają ogromnym wyzwaniem współczesnej medycyny, stanowią bowiem jedną z głównych przyczyn zgonów u dzieci i dorosłych [3].

Etiologia nowotworów OUN nie jest dokładnie poznana, jednak odkryte zostały potencjalne czynniki kancerogenne takie jak promieniowanie jonizujące, pole elektromagnetyczne, urazy głowy oraz predyspozycje genetyczne [4]. Zgodnie z Krajowym Rejestrem Nowotworów Centrum Onkologii zachorowalność na pierwotne złośliwe nowotwory OUN wynosi prawie 3000 przypadków rocznie, co obejmuje 2 % zachorowań na nowotwory złośliwe w Polsce. Ponad 70 % z nich stanowią glejaki, w przypadku których zachorowalność zwiększa się wraz z wiekiem, a drugą co do częstości występowania grupą są oponiaki [5,6].

1.2. Glejak wielopostaciowy

1.2.1. Epidemiologia i klasyfikacja

Około 49 % złośliwych pierwotnych guzów mózgu stanowią glejaki wielopostaciowe (GBM, and. *Glioblastoma*), a 30 % - glejaki o niskim stopniu złośliwości – tzw. LGG (ang. *Low-grade glioma*) [7]. Glejaki wywodzą się z komórek gleju, które stanowią najliczniejszą

grupę komórek ludzkiego mózgu. Głównie pełni rolę w transporcie substancji odżywczych do komórek nerwowych, współtworzeniu bariery krew-mózg, utrzymywaniu homeostazy jonowej oraz produkcji osłonki mielinowej. Głównymi typami komórek, z których powstają glejaki, tworzącymi tzw. makroglej są astrocyty, oligodendrocyty oraz ependymocyty [8,9].

Według tradycyjnej klasyfikacji opartej jedynie na morfologii komórek, glejaki podzielić można na następujące grupy: glejaki pochodzenia zarodkowego (rdzeniaki), glejaki pochodzenia astrocytarnego (gwiaździaki), glejaki gleju skąpowypustkowego (skąpodrzewiaki), glejaki gleju wyściółkowego (wyściółczaki) oraz glejaki mieszane złożone z różnych typów komórek [10]. Według aktualizacji klasyfikacji stworzonej w 2016 roku przez WHO glejaki podzielone zostały nie tylko ze względu na cechy fenotypowe, ale również cechy molekularne guza [11]. Ponadto wprowadzono czterostopniową skalę określającą stopień złośliwości poszczególnych glejaków (ang. *grading*), w której stopień I określa nowotwory najmniej złośliwe, a stopień IV najbardziej agresywne. Do najważniejszych zaburzeń genetycznych będących podstawą profilowania molekularnego glejaków należą:

- Mutacje w genach kodujących dehydrogenazy izocytrynianianowe 1 i 2 (IDH1 i IDH2, ang. *Isocitrate dehydrogenase 1 and 2*)
- Mutacje lizyny w pozycji 27 histonu 3 (K27M, ang. *Histone H3 lysine 27 methylation, H3*)
- Mutacje genu kodującego czynnik transkrypcyjny ATRX (ang. *Alpha-thalassemia/mental retardation, X-linked*)
- delecje 1p/19q
- Mutacje genu *TP53*
- Mutacje promotora *TERT* (ang. *Human telomerase reverse transcriptase*)
- Profil ekspresji receptora naskórkowego czynnika wzrostu EGFR (ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*)

W najnowszej wersji klasyfikacji nowotworów OUN wprowadzono wiele zmian dotyczących podziału glejaków oraz ich nazewnictwa, co wynikało z doniesień wskazujących na znacznie większe znaczenie profilu molekularnego w kontekście prognostycznym oraz terapeutycznym [12]. Poniższa tabela numer 1 ukazuje różnice w ostatnich dwóch wersjach klasyfikacji nowotworów OUN opublikowanych przez WHO.

Tabela 1. Klasyfikacja glejaków według WHO, edycja IV i V.

KLASYFIKACJA WHO IV EDYCJA (2016)	KLASYFIKACJA WHO V EDYCJA (2021)
Rozlane guzy astrocytarne i oligodendroglejowe: <ul style="list-style-type: none"> • gwiaździak rozlany, IDH-mutant • gwiaździak rozlany, IDH-wildtype • gwiaździak rozlany, NOS (ang. <i>not otherwise specified</i>) • gwiaździak anaplastyczny, IDH-mutant • gwiaździak anaplastyczny, IDH-wildtype • gwiaździak anaplastyczny, NOS • glejak wielopostaciowy, IDH-wildtype • glejak wielopostaciowy, IDH-mutant • glejak wielopostaciowy, NOS • rozlany glejak linii środkowej, H3K27M-mutant • skąpodrzewiak, IDH-mutant z kodecją 1p/19q • skąpodrzewiak, NOS • skąpodrzewiak anaplastyczny, IDH-mutant, kodecja 1p/19q • skąpodrzewiak anaplastyczny, NOS • skąpodrzewiakogwiaździak, NOS • skąpodrzewiakogwiaździak anaplastyczny, NOS 	Rozlane glejaki typu dorosłego: <ul style="list-style-type: none"> • gwiaździak, IDH-mutant • skąpodrzewiak, IDH-mutant z kodecją 1p/19q- • glejak wielopostaciowy, IDH-wildtype
	Rozlane glejaki o niskim stopniu złośliwości typu dziecięcego: <ul style="list-style-type: none"> • gwiaździak rozlany, MYB- or MYBL1-zmieniony • glejak angiocentryczny • polimorficzny guz neuroepitelialny o niskim stopniu złośliwości wieku dziecięcego • rozlany glejak o niskim stopniu złośliwości ze zmienionym szlakiem MAPK
Inne guzy astrocytarne: <ul style="list-style-type: none"> • gwiaździak włosatokomórkowy • gwiaździak podwyściółkowy • żółtakogwiaździak pleomorficzny • anaplastyczny żółtakogwiaździak pleomorficzny 	Rozlane glejaki o wysokim stopniu złośliwości typu dziecięcego: <ul style="list-style-type: none"> • rozlany glejak linii środkowej, H3 K27-zmieniony • rozlany glejak półkulowy, H3 G34-mutant • rozlany glejak o wysokim stopniu złośliwości typu dziecięcego, H3-wildtype and IDH-wildtype • glejak półkulowy wieku wczesnodziecięcego
	Ograniczone glejaki astrocytarne: <ul style="list-style-type: none"> • gwiaździak włosatokomórkowy • gwiaździak o wysokim stopniu złośliwości z cechami piloidalnymi • żółtakogwiaździak pleomorficzny • gwiaździak podwyściółkowy olbrzymiokomórkowy • glejak struniakowy • gwiaździak zarodkowy, MN1-zmieniony

Glejak wielopostaciowy jest najbardziej agresywnym i złośliwym rodzajem glejaka (IV stopień według skali WHO), na który co roku zapada około 5/100 000 osób. Częstość występowania GBM jest ściśle związana z wiekiem, a większość przypadków występuje u pacjentów powyżej 40 roku życia. Potwierdziły to badania Kai'a i współpracowników, w których wykazano, iż prawie 48 % pacjentów w momencie diagnozy miała powyżej 65 lat, a

ponad 46 % było w wieku od 40 do 60 lat [13]. Ponadto wskazuje się również na częstsze występowanie tego nowotworu u mężczyzn, co może być pośrednio związane z różnicami w gospodarce hormonalnej – w przypadku kobiet sugeruje się ochronną rolę estrogenu, a także sprzyjający na rozwój GBM wpływ receptorów androgenowych [14].

W przypadku GBM średni czas przeżycia przy zastosowaniu dostępnych standardów leczenia to mniej więcej 15 miesięcy, a 5-letni współczynnik przeżycia wynosi jedynie 5 %. Glejaki wielopostaciowe mogą rozwijać się *de novo* jako glejaki pierwotne lub powstawać w wyniku progresji glejaków o niższym stopniu złośliwości jako glejaki wtórne. W nowej klasyfikacji WHO z 2021 roku glejaki u dorosłych i dzieci zostały po raz pierwszy sklasyfikowane oddzielnie na podstawie różnic w patogenezie molekularnej i oceny przypuszczalnego przebiegu choroby. Według najnowszego podziału w grupie rozlanych glejaków dorosłych czynnikami klasyfikującymi poszczególne guzy jest obecność lub brak mutacji w genie *IDH* oraz obecność kodelecji 1p/19. W klasyfikacji z 2016 roku glejak wielopostaciowy występował jako podtyp *IDH*-wildtype, *IDH*-mutant lub NOS (and. *Not otherwise specified*). W najnowszym podziale GBM *IDH*-mutant zastąpiony został rozpoznaniem gwiazdziaka z obecną mutacją *IDH*, wyróżniony został również skąpodrzewiak z jednoczesną mutacją *IDH* oraz kodelecją 1p/19. Jest to ważne z perspektywy oceny prawdopodobnego rozwoju choroby, gdyż obecność mutacji *IDH* wiąże się z dłuższym przeżyciem i lepszymi rokowaniami [15].

1.2.2. Diagnostyka oraz leczenie

Objawy rozwoju glejaka wielopostaciowego zależą od jego wielkości i lokalizacji. Do objawów ogólnych należy wzrost ciśnienia śródczaszkowego, co może manifestować się poprzez bóle głowy, nudności, zaburzenia pamięci i świadomości, napady padaczkowe i upośledzenie psychoruchowe. Na podstawie objawów ogniskowych, które są ściśle uzależnione od dokładnego miejsca rozwoju guza, można wstępnie określić jego lokalizację – glejak rozwijający się w płacie czołowym może powodować zaburzenia osobowości, dysfazję oraz apraksję, natomiast guz umiejscowiony w płacie skroniowym prowadzi do omamów słuchowych i węchowych oraz zaburzeń pamięci [16].

Podstawowym narzędziem diagnostycznym glejaka wielopostaciowego jest tomografia komputerowa (TK ang. *Computed tomography*) oraz rezonans magnetyczny (MR, ang. *Magnetic resonance*). Zastosowanie TK pozwala na szybkie pozyskanie obrazu, ponadto jest to zdecydowanie bardziej dostępna metoda umożliwiająca szybką diagnostykę różnicową

między nowotworem, a krwotokiem mózgu [17]. Rezonans magnetyczny natomiast pozwala na łatwiejszą ocenę guzów poprzez dokładniejsze obrazowanie szczegółów anatomicznych mózgu oraz umożliwia skuteczniejsze wykrywanie nacieków nowotworowych [18]. Ostateczne rozpoznanie GBM opiera się na badaniu histopatologicznym oraz molekularnym śródoperacyjnie usuniętego guza, a jeśli całkowita resekcja guza jest niemożliwa, wykonuje się biopsję cienkoigłową. Obraz histologiczny GBM zwykle obejmuje polimorficzne, wrzecionowate, proliferujące komórki z atypowymi, zwiększonymi jądrami komórkowymi. Ponadto w komórkach glejaka obecne są duże wakuole tłuszczowe. Guzy GBM charakteryzują się dużym unaczynieniem oraz licznymi obszarami martwiczymi wywołanymi niedotlenieniem [19,20]. W celu potwierdzenia diagnozy stosuje się także barwienia immunohistochemiczne (IHC, ang. *Immunohistochemistry*), takie jak barwienie białka EGFR, P53, ATRX czy MDM2 w celu określenia poziomu ich ekspresji [21].

Mimo ogromnych postępów w diagnostyce GBM, ze względu na ogromną heterogenność guza, możliwości terapeutyczne są nadal bardzo ograniczone, a mediana przeżycia w przypadku zastosowania standardowej procedury leczenia waha się między 14 a 20 miesięcy. Leczenie bazujące na opublikowanym w 2005 protokole Stupp opiera się na resekcji chirurgicznej po której stosuje się chemioterapię połączoną z radioterapią [22,23]. Glejak wielopostaciowy jest nowotworem silnie naciekającym, co często uniemożliwia jego całkowite usunięcie i powoduje pojawianie się nawrotów. Dlatego też dostępny schemat leczenia zapewnia jedynie zmniejszenie tempa rozwoju guza, a nie całkowite wyleczenie [24]. Kolejnym problem w przypadku terapii GBM jest bariera krew mózg (BBB, ang. *Blood-brain barrier*), która jest selektywnie przepuszczalna dla leków, a jedynym obecnie dostępnym chemioterapeutycznym zdolnym do jej przeniknięcia jest temozolomid (TMZ, ang. *Temozolomide*). Metabolity TMZ wykazują działanie silnie alkilujące, co prowadzi do uszkodzenia DNA i śmierci komórek. U około 50 % pacjentów występuje jednak zwiększony poziom ekspresji enzymu MGMT (ang. *O6-alkylguanine DNA alkyltransferase*), który bierze udział w naprawie uszkodzonego DNA i zmniejsza cytotoksyczne działanie temozolomidu [25,26]. Niezwykle agresywny charakter komórek GBM uwarunkowany jest również ich zdolnością do hamowania odpowiedzi immunologicznej, dlatego też ostatnim kierunkiem poszukiwań nowatorskich możliwości terapeutycznych stała się immunoterapia. Obecnie trwają badania nad różnego rodzaju terapiami opartymi na inhibitorach punktów kontrolnych, zmodyfikowanych limfocytach T (CAR-T, ang. *Chimeric antigen receptor*) oraz szczepionkach wzmacniających antynowotworową odpowiedź immunologiczną [27,28]. Co

więcej, jedną z najnowszych metod terapeutycznych jest leczenie za pomocą zmiennych pól elektrycznych o niskim natężeniu (ang. *TFields*). Powoduje ono zahamowanie mitozy komórek nowotworowych i skierowanie ich na apoptozę, jednak tak jak w przypadku immunoterapii stanowi ono jedynie uzupełnienie standardowej ścieżki leczenia GBM [29,30].

1.2.3. Charakterystyka molekularna GBM

Glejak wielopostaciowy charakteryzuje się ogromną heterogennością nie tylko między guzami różnych pacjentów, ale również w obrębie jednego, tego samego guza. Jego wysoka inwazyjność oraz mała wrażliwością na radio- i chemioterapię ma swoje podłoże w zmienności molekularnej, której zrozumienie jest kluczowe dla rozwoju nowych potencjalnych metod terapeutycznych oraz dla postępu medycyny spersonalizowanej.

Najważniejszym kryterium diagnostycznym określającym agresywność danego guza jest obecność lub brak mutacji we wspomnianym wcześniej genie *IDH*. Enzym dehydrogenazy izocytrynianowej katalizuje oksydacyjną dekarboksylację izocytrynianu podczas cyklu Krebsa, odgrywając w ten sposób istotną rolę w utrzymaniu homeostazy komórkowej [31]. Przeprowadzone badania wykazały, że obecność mutacji w genie *IDH1* i *IDH2* jest korzystna prognostycznie, a mediana przeżycia u takich pacjentów była znacznie większa w porównaniu do pacjentów z profilem *IDH-wildtype* [32]. Inne istotne mutacje warunkujące profil molekularny poszczególnych guzów GBM przedstawione zostały w tabeli numer 2.

Tabela 2. Najważniejsze zmiany molekularne decydujące o agresywności guza GBM.

Nazwa	Znaczenie	Źródło
ATRX	Gen <i>ATRX</i> koduje białko zaangażowane w reorganizację chromatyny, a jego mutacje występują w ponad połowie wtórnych GBM oraz znacznie częściej w GBM <i>IDH-mutant</i> . Mutacje obecne w tym genie są pozytywnym czynnikiem prognostycznym.	[11,33]
Promotor genu TERT	Mutacje promotora genu <i>TERT</i> skutkują zwiększoną aktywnością odwrotnej telomerazy, co promuje rozwój GBM. Mutacje te występują znacznie częściej w GBM <i>IDH-wildtype</i> .	[11,34]
TP53	Mutacje genu <i>TP53</i> skorelowane są z progresją i inwazyjnością GBM promując niekontrolowaną proliferację komórek i zmniejszając apoptozę. Mutacje tego genu są znacznie częstsze w GBM <i>IDH-wildtype</i> i negatywnie wpływają na przeżywalność pacjentów.	[11,35]
B-RAF V600E	B-RAF jest częścią ścieżki związanej z regulacją wzrostu komórek, a mutacja V600E, która polega na substytucji waliny glutaminianem skutkuje niekontrolowanymi podziałami komórkowymi i propagowaniem formacji guza.	[36,37]
GATA4	Mutacje czynnika transkrypcyjnego <i>GATA4</i> skutkującego jego zmniejszonym poziomem ekspresji wpływają na zwiększoną proliferację i promowanie rozwoju oporności na chemioterapię, tak więc mogą być markerem prognostycznym odpowiedzi na leczenie.	[38,39]
FGFR1	Rodzina białek <i>FGFR</i> to transbłonowe receptory mające funkcję kinazy tyrozynowej, a ich zwiększony poziom ekspresji promuje inwazyjność i rozwój oporności na radioterapię, co negatywnie wpływa na przeżywalność pacjentów.	[40,41]
EGFR	Białko <i>EGFR</i> , mające funkcję kinazy tyrozynowej, wpływa na proliferację komórek, a jego zwiększony poziom w guzach GBM promuje ich rozwój i negatywnie wpływa na przeżywalność pacjentów. Mutacje <i>EGFR</i> znacznie częściej występują w GBM <i>IDH-wildtype</i> .	[42-44]
MGMT	<i>MGMT</i> jest białkiem odpowiedzialnym za naprawę DNA, a status metylacji jego promotora wpływa na skuteczność działania chemioterapii. Terapia temozolomidem u pacjentów z hipermetylacją promotora <i>MGMT</i> jest zdecydowanie skuteczniejsza niż u pacjentów z jego hipometylacją.	[45,46]
WT1	Mutacja genu <i>WT1</i> prowadzi do zwiększonego poziomu ekspresji tego czynnika transkrypcyjnego, co promuje rozwój GBM.	[47]
PTEN	Mutacje powodujące obniżenie poziomu ekspresji białka <i>PTEN</i> prowadzą do zwiększonej przeżywalności komórek i związane są z gorszymi prognozami.	[48,49]

1.2.3.1. Klasyfikacje molekularne GBM

W związku z ogromną heterogennością molekularną GBM zaistniała potrzeba podejścia spersonalizowanego i jeszcze lepszej klasyfikacji każdego guza, tak by móc wpłynąć na zwiększenie przeżywalności pacjentów, a także skuteczniej przewidzieć odpowiedź na leczenie w każdym konkretnym przypadku. Dzięki skatalogowaniu nieprawidłowości genetycznych 30 najczęstszych nowotworów, na podstawie ponad 10 tysięcy próbek, w ramach repozytorium TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*), uzyskano jeszcze szerszy obraz zmian molekularnych w glejaku wielopostaciowym [50]. Na podstawie tej bazy, w 2010 roku, Verhaack i współpracownicy zaproponowali nowe podtypy molekularne GBM bazujące na profilu ekspresji genów, mutacjach genetycznych oraz liczbie kopii DNA. Obejmują one 4 grupy: podtyp proneuralny, neuralny, klasyczny oraz mezenchymalny. Każdy z nich różni się stopniem agresywności, wrażliwością na chemio- i radioterapię oraz prognozami przeżycia. Różnice te zostały podsumowane w tabeli numer 3.

Tabela 3. Najważniejsze różnice między podtypami molekularnymi GBM zaproponowanymi przez Verhaacka i współpracowników.

Podtyp	Cechy charakterystyczne	Agresywność
Proneuralny	Mutacje <i>PDGFRA</i> i <i>IDH1</i>	Najmniejsza
Neuralny	Mutacje w <i>NEFL</i> , <i>GABRI</i> , <i>SLC12A5</i> i <i>SYT1</i>	Średnia
Klasyczny	Zwiększony poziom EGFR, brak mutacji <i>TP53</i> , delecja <i>CDKN2A</i> , delecja chromosomu 10	Średnia agresywność, większa niż w podtypie proneuralnym
Mezenchymalny	Mutacja <i>NF1</i> , <i>TP52</i> oraz <i>PTEN</i> , zwiększona aktywność ścieżki NF-κB	Największa

Kolejnym zaproponowanym podziałem GBM była klasyfikacja oparta na profilu metylacji opublikowana przez Brennana i współpracowników w 2013 roku [51]. Obecnie poszukiwane są nowe cząsteczki mogące jeszcze lepiej określić profil molekularny konkretnych guzów GBM, aby dokładniej zrozumieć naturę jego agresywności i zmienności. W ostatnim czasie szczególnie intensywnie skupiono się na niekodujących RNA (ncRNA, ang. *Non-coding RNA*), takich jak mikro RNA (miRNA, ang. *microRNA*) i długich niekodujących RNA (lncRNA, ang. *Long non-coding RNA*), które w sposób pośredni mogą

wpływać na biologię komórek glejaka i regulować najważniejsze procesy kancerogenezy [52,53].

1.2.3.2. Komórki macierzyste glejaka

W przypadku większości nowotworów potwierdzono związek między ich rozwojem, a obecnością niezróżnicowanych komórek o cechach komórek macierzystych, które charakteryzują się ogromnym potencjałem proliferacyjnym i dużą plastycznością. Zostały one określone jako nowotworowe komórki macierzyste (CSC, ang. *Cancer stem cell*) i odpowiedzialne są za progresję guza, rozwój oporności na leczenie, występowanie przerzutów oraz regulację angiogenezy [54-56]. W ostatnich latach ustalono, że komórki macierzyste glejaka (GSC, ang. *Glioblastoma stem cell*), są kluczowym elementem jego wysokiej agresywności oraz zdolności do nawrotów, co wskazuje na ogromny potencjał ukierunkowania terapii w ich stronę, w celu skuteczniejszej walki z GBM [57]. Singh i współpracownicy jako pierwsi przedstawili dowody na obecność komórek macierzystych GBM, odkrywając populację komórek zdolnych do inicjacji wzrostu guza *in vivo* [58]. Markerem powierzchniowych tych komórek jest CD133, znany też jako prominina-1, a określenie poziomu ekspresji tego białka pomaga w określeniu potencjału samoodnawiania guza [59]. Komórki macierzyste GBM są często zlokalizowane w specyficznych mikrośrodowiskach guza, zwanych niszami komórek macierzystych. Nisze te tworzą korzystne warunki dla utrzymania GSC. W glejaku wielopostaciowym komórki macierzyste są umiejscowione w rdzeniu guza (ang. *Core*) co jest niezwykle ważne dla ich funkcjonowania, ponieważ obecne tam środowisko charakteryzuje się niedoborem tlenu. Warunki hipoksyjne sprzyjają nie tylko rozwojowi angiogenezy, ale również wzmagają agresywność guza, w tym ekspansję i promowanie komórek macierzystych poprzez aktywację szlaku czynnika indukowanego hipoksją 1 (HIF-1 ang. *Hypoxia inducible factor 1*) [60,61]. Brak skutecznej terapii uwzględniającej komórki macierzyste glejaka jako jeden z celów terapeutycznych uważa się obecnie za główny powód niepowodzeń w leczeniu tego nowotworu i jego nieuniknionego nawrotu [62].

1.2.3.3. Przejście nabłonkowo-mezenchymalne

Przejście nabłonkowo-mezenchymalne (EMT, ang. *Epithelial-to-mesenchymal transition*) to złożony proces zachodzący naturalnie w zdrowym organizmie podczas rozwoju embrionalnego oraz w przebiegu gojenia się ran [63]. Zjawisko to towarzyszy również progresji nowotworu, kiedy to zróżnicowane komórki nabłonkowe tracą swoją określoną

polarność, adhezyjność oraz połączenie z innymi komórkami, przekształcając się pod względem morfologicznym i molekularnym w komórki mezenchymalne. Ten typ komórek charakteryzuje się dużą ruchliwością, inwazyjnością, a także zwiększonym potencjałem proliferacyjnym, co przyczynia się do agresywnego charakteru nowotworów [64]. Najbardziej charakterystycznymi markerami EMT, których ekspresja wzrasta w wyniku tego procesu, są białka związane z adhezją i ruchem komórek takie jak: N-kadheryna, wimentyna, czynniki transkrypcyjne Snail1 i Snail2, Twist, ZEB1 oraz metaloproteinazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP, ang. *Metalloproteinase*). Częściki, których ekspresja ulega obniżeniu podczas tego procesu to między innymi: E-kadheryna, okludyna i β -katenina, które w fizjologicznych warunkach odpowiedzialne są za utrzymanie integralności komórek [65].

W glejaku wielopostaciowym EMT jest bardzo ważnym procesem, który warunkuje wysoką inwazyjność oraz występowanie nawrotów, umożliwiając komórkom odrywanie się od masy pierwotnego guza, a co za tym idzie ich migrację i naciekanie sąsiadujących zdrowych tkanek [66,67]. W przypadku GBM proces EMT jest ściśle związany z komórkami macierzystymi glejaka, które podobnie do komórek mezenchymalnych mają wiele cech wspólnych z GSC, takich jak zwiększony potencjał proliferacyjny oraz zdolność do samoodnawiania przy zachowaniu ich niezróżnicowanego charakteru [68]. Ponadto, proces ten, jest także związany z angiogenezą, która jest kluczowym procesem przy wzroście guza i rozwoju wokół niego nowych naczyń krwionośnych, mających za zadanie dostarczanie tlenu oraz substancji odżywczych do komórek nowotworowych [69,70]. Wszystkie te cechy oraz fakt, iż EMT jest procesem odwracalnym powodują, iż stał się on obiecującym celem nowych terapii GBM [71-73].

1.2.3.4. Mikrośrodowisko guza - macierz zewnątrzkomórkowa i pęcherzyki zewnątrzkomórkowe

Mikrośrodowisko guza to bardzo złożona i dynamiczna sieć powiązań między komórkami i substancjami pozakomórkowymi, które otaczają tkankę nowotworową. W sieci tej występują nie tylko komórki nowotworowe, ale również fibroblasty – tak zwane fibroblasty związane z nowotworem (CAF – ang. *Cancer associated fibroblast*) oraz komórki układu odpornościowego. W skład mikrośrodowiska guza wchodzi także niekomórkowe składniki, takie jak kolagen, fibronektyny, lamininy, różnego rodzaju proteoglikany i glikozaminoglikany, które tworzą macierz zewnątrzkomórkową (ECM, ang. *Extracellular matrix*), której skład jest specyficzny tkankowo i podlega ciągłym przemianom. ECM pełni funkcje nie tylko rusztowania dla komórek, ale odpowiada również za transport czynników

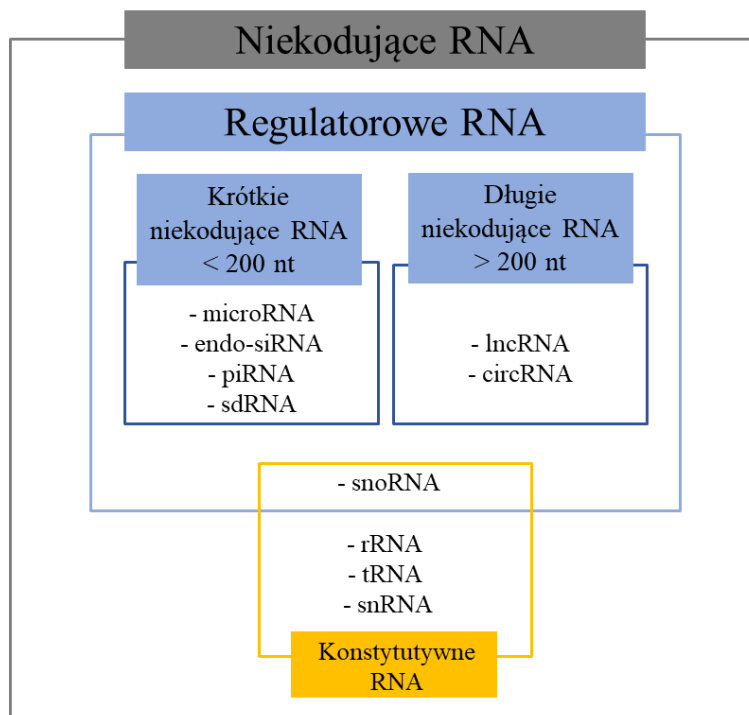
wzrostu i pośredniczy w przekazywaniu sygnałów biochemicznych [74,75]. W macierzy zewnątrzkomórkowej zdrowego mózgu i GBM występują znaczne różnice – w przypadku tego pierwszego, ogólna gęstość i sztywność ECM jest stosunkowo niska, ponadto obecne są w niej białka biorące udział w dojrzewaniu neuronów. W przypadku glejaka wielopostaciowego gęstość ECM jest zdecydowanie większa, a białka będące jej częścią promują angiogenezę i inwazję [76]. Zwiększone usieciwienie ECM w guzie powoduje osłabienie odpowiedzi na leczenie, ponieważ większa gęstość stanowi mechaniczną przeszkodę w dostarczaniu terapeutyków [77]. Usztywnienie ECM spowodowane jest odkładaniem się kolagenu, fibronektyn oraz tenascyny, a także zwiększoną produkcją i wydzielaniem czynników prozapalnych takich jak różnego rodzaju cytokiny czy czynniki wzrostu [78]. Sztywność ECM jest także odpowiedzialna za wywołanie niedotlenienia poprzez naciskanie na otaczające guz naczynia krwionośne. Wpływa to na indukcję szlaku oddychania beztlenowego, które jest w komórkach nowotworowych preferencyjne i nazwane zostało efektem Warburga [79,80]. Warto również zaznaczyć, iż ECM w przypadku guzów GBM jest niezwykle dynamiczna i podlega wielu stosunkowo szybkim zmianom, co spowodowane jest zwiększoną obecnością różnego rodzaju metaloproteinaz, które nie tylko modelują środowisko guza, ale wpływają też na inwazję otaczających guz tkanek zdrowego mózgu [81].

Mikrośrodowisko guza pełni również rolę pośrednika w komunikacji między komórkami nowotworowymi, co w przypadku GBM odgrywa niezwykle ważną rolę. Komórki glejaka kontaktują się bowiem nie tylko ze sobą, ale również ze zdrowymi komórkami mózgu wpływając na rozwój guza [82]. Komunikacja ta odbywa się poprzez bezpośrednie połączenia międzykomórkowe, ale również przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV, ang. *Extracellular vesicles*). To uwalniane przez komórki małe struktury błonowe (wielkości od 30 nm do 1 um), obserwowane w praktycznie wszystkich płynach fizjologicznych. Zawierają one różnego rodzaju białka, fragmenty DNA, mRNA oraz niekodujące RNA [83,84]. W wielu przypadkach EV uwalniane są konstytutywnie przez zdrowe tkanki, jednak nierzadko produkowane i wydzielane są przez komórki nowotworowe [85,86]. Pęcherzyki docierają do innych komórek docelowych i są przez nie pobierane niespecyficzne za pomocą makropinocytozy lub fagocytozy. Mogą być także rozpoznawane specyficznie za pomocą oddziaływać receptor-ligand na drodze zależnej od klatryny lub kaweolin i pobierane na drodze endocytozy [87]. Po wnikięciu do komórek zawartość EV zostaje uwolniona, a cząsteczki w niej zawarte mogą wpływać na różnego rodzaju procesy komórkowe [88].

W przypadku GBM zidentyfikowano szerokie spektrum pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, które przenoszą nie tylko białka, ale również niekodujące RNA, które wpływają na zmianę ekspresji genów w komórkach docelowych przez co promować mogą procesy związane z rozwojem nowotworu, takie jak proliferacja, inwazja czy angiogeneza [89-91]. Wpływają one nie tylko na inne komórki glejaka czy zdrowe komórki mózgu, ale również na komórki układu odpornościowego, takie jak makrofagi związane z nowotworem (TAM, ang. *Tumor-associated macrophages*). Wykazano, że EV uwalniane z linii komórkowej GBM zdolne są do modyfikacji fenotypu TAM, zmieniając ich profil na przeciwwzapalny i wspierając rozwój guza m.in. poprzez produkcję cytokin, czynników wzrostu oraz enzymów degradujących macierz zewnątrzkomórkową [92]. Badania te poparły kolejne dowody na pobieranie przez TAM pęcherzyków zawierających różnego rodzaju onkogenne microRNA [93,94]. Istnieją liczne doniesienia o zdolności EV do pokonywania bariery krew-mózg, dzięki czemu są one w stanie oddziaływać nie tylko lokalnie, na komórki zlokalizowane w mózgu, ale również na cały organizm [95,96]. W serum pacjentów chorych na glejaka zidentyfikowano EV, w których znajdował się lncRNA HOTAIR promujący rozwój oporności komórek glejaka na temozolomid [97]. Z kolei w białkach transportowanych do serum przez pęcherzyki zewnątrzkomórkowe z guza, upatruje się potencjalne biomarkery rozwoju glejaka, które w łatwy i szybki sposób mogłyby wspomóc diagnostykę oraz monitorowanie rozwoju tego nowotworu [98].

1.3. Kolistę RNA

Odkrycie i zastosowanie metod wysokoprzepustowego sekwencjonowania pozwoliło na ujawnienie szerokiej gamy niekodujących RNA oraz odkrycie, że stanowią one większość całej informacji genetycznej [99]. Klasyfikacja niekodujących RNA obejmuje dwie grupy - RNA konstytutywne, które są niezbędne do utrzymania homeostazy komórkowej, takie jak rRNA (ang. *Ribosomal RNA*) czy tRNA (ang. *Transfer RNA*) oraz regulatorowe RNA. Regulatorowe RNA można dalej podzielić, w zależności od ich długości, na krótkie - dla transkryptów krótszych niż 200 nukleotydów i długie, które mają długość większą niż 200 nukleotydów. Schemat klasyfikacji niekodujących RNA został przedstawiony na rycinie numer 1.



Rycina 1. Klasyfikacja niekodujących RNA.

Dzięki nowym narzędziom molekularnym badanie struktur, funkcji oraz lokalizacji niekodujących RNA stało się możliwe i bardzo szybko jasnym stało się, że cząsteczki te odgrywają znaczącą rolę nie tylko w procesach fizjologicznych, ale również w progresji nowotworów. Najlepiej poznaną grupą regulatorowych RNA są miRNA oraz lncRNA, które mogą działać zarówno jako promotory jak i supresory nowotworu [100,101]. W ostatnim czasie dużą uwagę skupiono na innych regulatorowych RNA takich jak piRNA (ang. *Piwi-interacting RNA*), sdRNA (ang. *SnoRNA-derived RNA*) czy koliste RNA (circRNA ang. *Circular RNA*) [102-104].

Koliste RNA stanowią grupę endogennych jednoniciowych RNA, których długość waha się od około 100 do 4000 nukleotydów. Powstają one ze swoich liniowych, rodzicielskich odpowiedników mRNA (ang. *Messenger RNA*), a to co wyróżnia je spośród innych regulatorowych RNA, to kowalencyjnie zamknięta struktura oraz brak 3' końca z ogonem poliA oraz 5' końca z czapczką [105]. Dzięki temu są one odporne na degradację przez rybonukleazę R (RNaza R ang. *Ribonuclease R*) [106]. Miejsce wiązania końca 5' z końcem 3', nazywane BSJ (ang. *Back-splice junction site*), umożliwia ich identyfikację i odróżnia od liniowego odpowiednika. Dzięki swojej strukturze koliste RNA posiadają dłuższy

okres półtrwania od swoich liniowych form rodzicielskich [107]. Ponadto wykazano obecność cyrkulujących kolistych RNA w EV w różnych płynach fizjologicznych, w tym w krwi, co czyni z nich obiecujących kandydatów w kontekście poszukiwania nowych biomarkerów [108].

1.3.1. Historia i klasyfikacja kolistych RNA

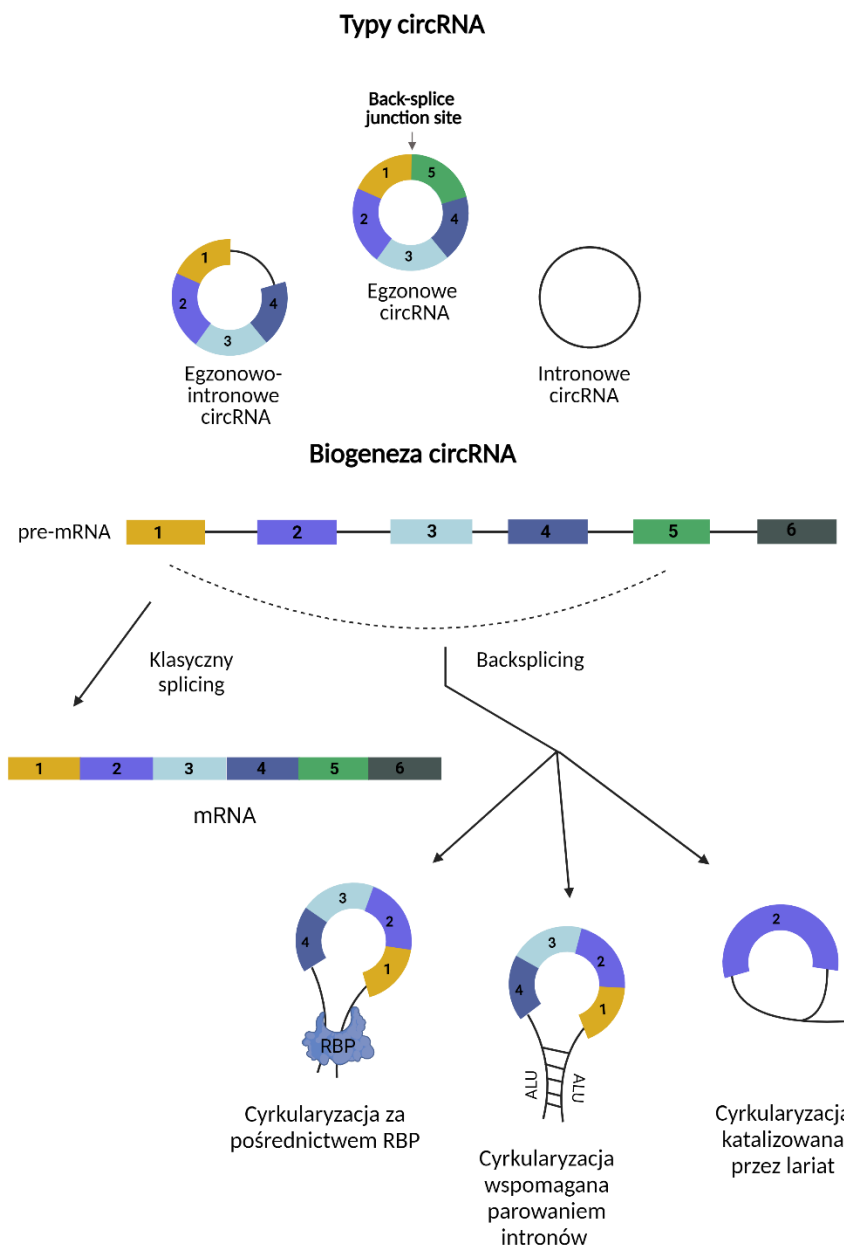
Po raz pierwszy istnienie kolistych RNA udowodnił Sanger i współpracownicy w 1976 roku, kiedy to zidentyfikowali oni chorobotwórcze wiroidy roślinne. Po 3 latach udokumentowano istnienie eukariotycznych circRNA, a pierwszym odkrytym u człowieka kolistym RNA był wirus zapalenia wątroby typu delta (HDV) [109,110]. Następnie, w latach 90., odkryto endogenne cząsteczki RNA pozbawione wolnych końców 5' i 3', opisane jako produkty niekanonicznego splicingu pochodzące z genu DCC (ang. *Deleted in colorectal carcinoma*), jednak ulegały one ekspresji na bardzo niskim poziomie, dlatego też uznano je za artefakty transkrypcji [111]. Dopiero rozwój technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania RNA umożliwił identyfikację tysięcy kolistych RNA i spowodował wyraźny wzrost zainteresowania tymi cząsteczkami w kontekście procesów fizjologicznych oraz chorobotwórczych. W 2013 Salzman i współpracownicy udowodnili, że niektóre circRNA posiadają znacznie wyższy od swoich liniowych odpowiedników poziom ekspresji, co wskazało na preferencyjne powstawanie circRNA podczas splicingu [112-114]. Był to przełomowy moment w badaniu tych cząsteczek, które okazały się być istotnymi regulatorowymi RNA powstającymi głównie z sekwencji kodujących, obecne wśród wszystkich przedstawicieli królestwa eukariotycznego [115]. Wtedy też powstały pierwsze bazy danych zbierające informacje o tysiącach nowo odkrywanych kolistych RNA takie jak circBase, CIRCpedia czy CircInteractome, które nie tylko umożliwiły usystematyzowanie i unifikację nazewnictwa, ale również pozwoliły odkryć ich tkankowo specyficzny charakter oraz niezwykle liczne występowanie m.in. w ludzkim mózgu [116-120].

1.3.2. Biogeneza kolistych RNA

Unikalna dla kolistych RNA struktura powstaje podczas tzw. backsplicingu – procesu, który znacznie różni się od kanonicznego splicingu. W backsplicingu miejsce splicingowe 3' położone poniżej (ang. *downstream*) łączone jest z miejscem 5' miejsca splicingowego położonego powyżej (ang. *upstream*), więc w sposób odwrotny niż w klasycznym splicingu. Co ciekawe wykazano, że w backsplicingu bierze także udział spliceosom, ponieważ zastosowanie inhibitora tego kompleksu, jakim jest izoginkgetyna, spowodowało obniżenie

poziomu ekspresji nie tylko mRNA, ale również ich kolistych odpowiedników [121]. Odkryto także, że poziom ekspresji circRNA nie zawsze koreluje z poziomem ekspresji jego liniowej formy, co wskazuje na to, że ekspresja obu tych transkryptów jest ściśle kontrolowana, a spliceosom musi być zdolny do wyboru pomiędzy kanonicznym splicingiem, a backsplicingiem [122].

Dokładny mechanizm powstawania kolistych RNA zależy od typu circRNA. Wyróżniamy 3 typy: egzonowe circRNA, intronowe circRNA oraz egzonowo-intronowe circRNA, przy czym te pierwsze stanowią znaczną większość wszystkich naturalnie występujących cząsteczek [112]. Główne mechanizmy odpowiedzialne za biogenezę circRNA to: cyrkularyzacja za pośrednictwem białek wiążących RNA (RBP, ang. *RNA-binding protein*), cyrkularyzacja wspomagana parowaniem intronów oraz cyrkularyzacja katalizowana przez lariat. Uproszczony schemat biogenezy oraz typów kolistych RNA przedstawiony został na rycinie numer 2.



Rycina 2. Uproszczony schemat typów i biogenezy kolistych RNA.

Pierwszy mechanizm zakłada udział RBP, które wiążą się do regionów flankujących sekwencję kolistych RNA i zблиżają do siebie koniec 5' i 3', wspomagając w ten sposób proces cyrkularyzacji. W ten sposób powstają egzonowe oraz egzonowo-intronowe circRNA [123,124]. Przykładem takiego białka, może być QKI, które należy do rodziny białek STAR (ang. *Signal transduction and activation of RNA*) oraz białko ADAR (ang. *Adenosine deaminase RNA specific*). Oba te białka zaangażowane są w kancerogenezę, a ich podwyższony poziom promuje biogenezę wielu kolistych RNA [123,125]. Kolejnym ciekawym przykładem białka potencjalnie zaangażowanego w biogenezę circRNA jest białko FUS, które

jest znanym i ważnym czynnikiem biorącym udział w kanonicznym splicingu. W kontekście powstawania kolistych RNA jego udział został udowodniony w przypadku neuronów ruchowych pochodzących z embrionalnych komórek macierzystych myszy oraz w komórkach pacjentów ze stwardnieniem zanikowym bocznym, co może wskazywać na jego istotną rolę w koordynowaniu biogenezy kolistych RNA w obrębie układu nerwowego [126,127].

Mechanizm związany z parowaniem intronów jest związany z powstawaniem zarówno egzonowych jak i egzonowo-intronowych circRNA. W tym przypadku w pre-mRNA introny okalające sekwencję circRNA zawierają odwrócone komplementarnie sekwencje, co prowadzi do parowania tych regionów z obu stron i promowania cykularyzacji cząsteczki [112,128,129].

Ostatni ze znanych mechanizmów biogenezy kolistych RNA związany jest ze zjawiskiem omijania egzonów (ang. *Exon-skipping*). W tym przypadku lariat, który jest produktem ubocznym splicingu, nadal pozostaje połączony z ominiętym egzonem lub egzonami. W dalszym etapie z powstałej cząsteczki może zostać usunięty intron, co prowadzi do powstania egzonowych circRNA, jednak może on również pozostać częścią powstałej cząsteczki tworząc egzonowo-intronowe circRNA. Ponadto w przypadku tego mechanizmu może również dojść do powstania wyłącznie intronowego circRNA, co promowane jest przez 11-nukleotydowy motyw bogaty w reszty C oraz 7-nukleotydowy element bogaty w reszty GU w pobliżu miejsca splicingowego 5' [130,131].

Co ciekawe typ kolistego RNA decyduje o jego subkomórkowej lokalizacji – intronowe oraz egzonowo-intronowe circRNA zlokalizowane są głównie w jądrze komórkowym, w którym powstają, natomiast egzonowe circRNA znajdują się w cytoplazmie, co ma swoje następstwa również w pełnionych przez nich funkcjach. W przypadku mRNA dokładnie znane są mechanizmy odpowiedzialne za jego transport przez pory jądrowe do cytozolu, jednak w przypadku kolistych cząsteczek niewyjaśnionym pozostaje fakt w jaki sposób, mimo braku 5' czapeczki, ulegają one translokacji na zewnątrz jądra komórkowego [132,133]. Ostatnie badania wskazują również na obecność kolistych RNA w innych kompartmentach komórkowych takich jak mitochondria, jednak i w tym przypadku niewiele wiadomo o charakterze ich selekcji i transportu [134-136].

1.3.3. Degradacja kolistych RNA

Średni okres półtrwania kolistych RNA wynosi 48 godzin co jest zdecydowanie dłuższym czasem w porównaniu do średniej wynoszącej 10 godzin w przypadku mRNA [107].

Co ciekawe circRNA ulegają bardzo szybkiej degradacji w ludzkim serum, co wskazuje na rolę pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jako transporterów, które chronią koliste RNA przed działaniem różnych enzymów [137]. Do dnia dzisiejszego nieznane są jednak dokładne czynniki odpowiedzialne za degradujące kolistych RNA, które ze względu na swoją budowę odporne są na działanie większości rybonukleaz [138].

Obecnie proponowanych jest kilka potencjalnych mechanizmów odpowiedzialnych za degradację kolistych RNA. Pierwszym z nich jest mechanizm degradacji przez rybonukleazę H1, która może dokonywać hydrolizy wiązań, które w przypadku kolistych RNA bogate są w reszty GC, przez co mogą formować pętle R wchodząc w miejscowe interakcje z DNA. Dotyczyć to może jednak jedynie cząsteczek, które występują w jądrze komórkowym [139]. Kolejnymi potencjalnymi czynnikami degradującymi circRNA są białka GW182 oraz Ago2 [140,141]. Wykazano, iż o degradacji kolistych RNA może decydować modyfikacja m6A, która polega na metylacji N6-adenozyny, a na stabilność circRNA może wpływać poprzez rekrutację białka YTHDF2 w kompleksie z rybonukleazą P [142,143]. Badania wskazały też, że część kolistych RNA może być wrażliwa na n-tlenek trimetyloaminy, który jest wytwarzany przez mikroflorę jelitową pod wpływem diety bogatej w cukry i tłuszcze [144].

Niejasne pozostaje jednak czy i jaki mechanizm jest głównym sposobem degradacji kolistych cząsteczek, ponieważ dotychczas zaproponowane modele sugerują degradację jedynie poszczególnych circRNA, posiadających specyficzne motywy strukturalne lub modyfikacje, nie mogą więc być traktowane jak powszechny system eliminacji tych cząsteczek przez komórki [145].

1.3.4. Funkcje kolistych RNA

Koliste RNA pełnią szeroką gamę funkcji zarówno w kontekście procesów fizjologicznych, ale biorą również udział w przebiegu wielu stanów patologicznych, w tym w kancerogenezie [146]. CircRNA działają na wielu poziomach różnego rodzaju procesów komórkowych za pomocą czterech podstawowych mechanizmów: interakcji z miRNA (ang. *Sponging*), wiązania białek (ang. *sequestering*), regulacji ekspresji innych transkryptów oraz ulegania translacji [147].

1.3.4.1. Oddziaływanie z miRNA

Interakcje z miRNA są szczególnie interesującą i szeroko opisaną funkcją kolistych RNA. MiRNA są krótkimi (21-23 nukleotydów) niekodującymi RNA, które regulują

ekspresję genów poprzez dwa główne mechanizmy: represję translacji oraz destabilizację transkryptów, z którymi się wiążą zgodnie z regułą komplementarności. MiRNA stanowią niezwykle ważny element sieci regulującej ekspresję genów, ponieważ szacuje się, że prawie jedna trzecia ludzkiego mRNA może być celem różnych miRNA [148]. Każde miRNA może oddziaływać z wieloma mRNA, dlatego też mają one potencjał do regulowania ekspresji wielu różnych genów jednocześnie [149]. Kolisty RNA mogą wpływać na funkcjonowanie miRNA poprzez regulację ich biodostępności – circRNA posiadają miejsca wiązania z poszczególnymi miRNA stanowiąc dla nich tzw. molekularne „gąbki” co utrudnia im wiązanie się z docelowym mRNA i prowadzi do zwiększenia poziomu ekspresji białka. Pojedyncza cząsteczka kolistego RNA może wiązać się z kilkoma różnymi miRNA jednocześnie lub/i posiadać wiele miejsc wiązania dla tego samego miRNA [150,151]. Jednym z lepiej poznanych circRNA, w przypadku, którego bardzo dokładnie został opisany mechanizm wiązania miRNA jest CDR1as (ang. *Cerebellar degeneration-related protein 1 antisense*). Cząsteczka ta posiada aż 70 miejsc wiązania z miR-7, które jest zaangażowane w rozwój wielu różnych nowotworów poprzez udział w regulacji procesów fizjologicznych w mózgu. Udowodniono, iż usunięcie z genomu myszy kolistej cząsteczki CDR1as powoduje ich upośledzenie sensomotoryczne, co wskazuje na ważną rolę tej cząsteczki w regulacji prawidłowego funkcjonowania mózgu [152,153]. Nie wszystkie kolisty RNA pełnią funkcję molekularnych „gąbek” dla miRNA, ponieważ większość circRNA to cząsteczki o długości około 500 nukleotydów, są więc zbyt krótkie, by posiadać wiele potencjalnych miejsc wiązania [154]. Nadal jednak nierozstrzygniętym pozostaje dokładny mechanizm interakcji między tymi dwoma rodzajami cząsteczek. Część badaczy wskazuje, iż kolisty RNA jedynie blokują działanie miRNA przez ograniczenie ich biodostępności, natomiast inni postulują schemat działania, w którym circRNA mogą degradować miRNA. W przypadku CDR1as badania wskazały na możliwą degradację miR-671 przez AGO2. W tym przypadku wykazano pełną komplementarność miR-671 i CDR1as co mogłoby wskazywać, iż mechanizm wiązania lub degradacji miRNA zależny może być od tego, czy między tymi dwoma cząsteczkami występuje pełna czy tylko częściowa komplementarność [145,153].

1.3.4.2. Oddziaływanie z RBP

RBP mogą wpływać na biogenezę circRNA, wykazano jednak, iż circRNA mogą również wpływać na biomodulację białek. Białka mogą być wiązane przez circRNA, co pozwala zarówno na hamowanie jak i stymulację ich działania [155,156]. Interakcje circRNA z białkami można w uproszczeniu podzielić na trzy grupy:

- wiązanie circRNA z dwoma białkami jednocześnie i wzmaganie ich wzajemnych interakcji.
- interakcja circRNA z jednym białkiem i hamowanie jego działania,
- interakcja circRNA z jednym białkiem i wzmacnianie jego działania,

W przypadku pierwszego rodzaju oddziaływań circRNA pośredniczy głównie w modyfikacjach potranslacyjnych (takich jak ubikwitynacja i fosforylacja) poprzez ułatwianie interakcji między białkiem poddawanym modyfikacji, a białkiem katalizującym modyfikację. Ponadto koliste RNA mogą wpływać na promowanie interakcji między dwoma różnymi białkami, wzmacniając ich wzajemne oddziaływanie. Przykładem może być circFoxo2, który wchodzi w interakcję z białkiem P53 oraz MDM2 (ang. *Mouse double minute 2 homolog*) wzmagając ubikwitynację tego pierwszego, co z kolei wpływa na apoptozę i wrażliwość komórek na chemioterapię [157]. Podobnie circNfix wzmacnia wiązanie się białka YBX1 (ang. *Y-box binding protein 1*) z ligazą ubikwitynową NEDD4L (ang. *Neural precursor cell expressed developmentally downregulated gene 4-like*) co hamuje proliferację kardiomiocytów i wpływa na apoptozę po zawale mięśnia sercowego u myszy [158]. W przypadku mechanizmu związanego ze wzmacnianiem interakcji między białkami, wykazano, iż circCTNNB1 promuje rozwój nowotworu piersi poprzez wzmacnianie oddziaływania białka YY1 (ang. *Ying yang 1*) i białka DDX3 (ang. *DEAD-box helicase 3*) co zwiększa ekspresję docelowych genów zaangażowanych w aktywację beta kateniny [159].

CircRNA mogą także blokować interakcję białka z innymi cząsteczkami. Niedawnym przełomem było odkrycie, że circSCAR (ang. *Steatohepatitis-associated circRNA ATP5B regulator*) kodowany przez genom mitochondrialny może wiązać się z podjednostką ATP5B (ang. *ATP synthase subunit b*), która znajduje się w kompleksie porów i blokować ich interakcję z cyklofiną D, co z kolei hamuje wytwarzanie reaktywnych form tlenu [135].

Wzmacnianie działania białka przez circRNA może odbywać się na drodze jego retencji lub redystrybucji w komórkach. CircAmotl1, który występuje w jądrze komórkowym, wiąże się z białkiem c-Myc zwiększając w ten sposób jego stabilność i retencję jądrową co z kolei wzmacnia jego działania jako czynnika transkrypcyjnego genów promujących proliferację i inwazję nowotworu [160]. Ten sam kolisty RNA może również wpływać na translokację białka STAT3 (ang. *Signal transducer and activator of transcription 3*) do jądra komórkowego co powoduje jego wiązanie się z promotorem DNMT3a (ang. *DNA cytosine-5-methyltransferase 3A*) i aktywację jego transkrypcji. W przypadku circFoxo3 zaobserwowano

z kolei jego wpływ na translokacje białka PTBP1 (ang. *Polypyrimidine tract-binding protein 1*) do cytoplazmy [161].

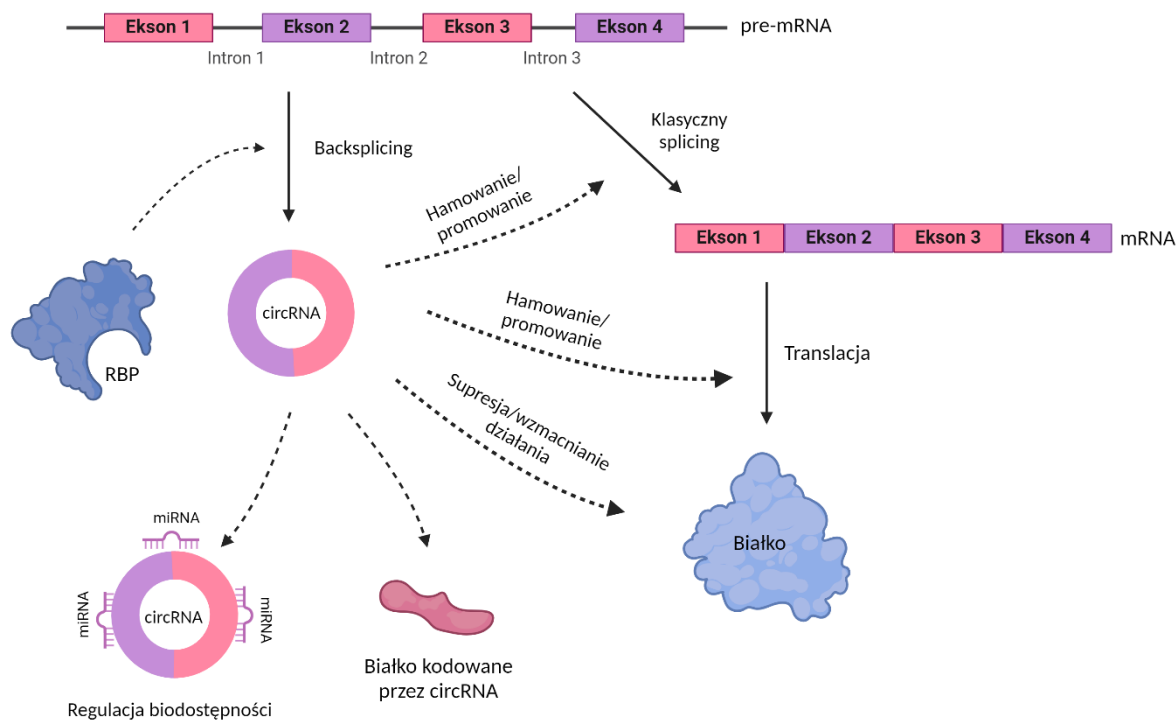
Koliste RNA mogą wpływać na transkrypcję oraz translację zarówno pozytywnie jak i negatywnie. Najczęściej wpływają na ekspresję swoich liniowych odpowiedników, jednak znane są również przykłady regulacji ekspresji innych cząsteczek [162]. Jednymi z pierwszych kolistych RNA, w przypadku których udowodniony został ich wpływ na transkrypcję, były egzonowo-intronowe circRNA, takie jak circEIF3J i circPAIP2 znajdujące się w jądrze komórkowy, które związane były z działaniem U1 snRNP (ang. *Small nuclear ribonucleoprotein*) i wpływały na inicjację transkrypcji. Obniżenie poziomu ekspresji wspomnianych circRNA za pomocą ASO (ang. *antisense oligonucleotide*) i siRNA (ang. *small interfering RNA*) powoduje zmniejszenie poziomu ekspresji ich liniowych odpowiedników bez wpływu na ekspresję innych mRNA [163]. Ponadto koliste RNA wpływają także na etap elongacji transkrypcji. CircANKRD52, który jest intronowym circRNA wzmacnia transkrypcję swojego liniowego odpowiednika poprzez interakcję z ufosforylowaną podjednostką polimerazy II [130]. Koliste RNA mogą również wpływać na splicing – circSEP3 faworyzuje alternatywny splicing swojego liniowego odpowiednika, a circSMARCA5 stymuluje czynnik splicingowy SRSF1 (ang. *Serine and arginine rich splicing factor 1*), który następnie moduluje ekspresję izoform SRSF3 (ang. *Serine and arginine rich splicing factor 3*) [164,165]. CircRNA mogą także współzawodniczyć ze swoim liniowym odpowiednikiem w trakcie splicingu, czego przykładem może być circMbl [124].

Koliste RNA mogą również wpływać na ekspresję mRNA poprzez regulację translacji. Odkryto, iż circPABPN1 wchodzi w interakcję z białkiem HuR (ang. *Human antigen R*) i obniża poziom ekspresji swojego liniowego odpowiednika poprzez represję etapu inicjacji translacji [166]. Kolejnym kolistym RNA wchodzącym w interakcję z białkiem HuR jest circBACH1. HuR w fizjologicznych warunkach hamuje translację inhibitora kinazy zależnej od cyklin p27. W komórkach nowotworu wątroby circBACH1 wpływa na translokację tego białka do cytoplazmy co z kolei wpływa na zmniejszony poziom ekspresji p27 [167].

1.3.4.3. Uleganie translacji

Ostatnio odkryto, iż koliste RNA mogą służyć także jako matryca do syntezy białka. Początkowo nie brano pod uwagę tej możliwości, ze względu na brak 5' czapeczki oraz 3' ogona poliA w strukturze tych cząsteczek. Badania wykazały jednak, iż niektóre koliste RNA

mogą ulegać translacji w mechanizmie niezależnym od czapeczki, ze względu na obecność w ich sekwencji wewnętrznych miejsc wiązania rybosomu (IRES ang. *Internal ribosome entry site*) oraz otwartych ramek odczytu (ORF, ang. *Open reading frame*) [168-170]. IRES umożliwiają związanie się podjednostki 40S rRNA bez konieczności obecności 5' UTR. (ang. *Untranslated region*) [171]. W późniejszym czasie odkryto również kolejny mechanizm umożliwiający translację circRNA związany z metylacją N6-adenozyny, która odpowiada za możliwość bezpośredniego związania eukariotycznego czynnika inicjacji translacji i rekrutację 40S rRNA. W tym przypadku koliste RNA nie posiadały sekwencji IRES, a jedynie ORF [172,173]. Pośród circRNA posiadających potencjał kodujący białko jedną z najlepiej poznanych cząsteczek jest circZNF609, który jest matrycą dla translacji białka o długości 251 aminokwasów, które bierze udział w dojrzewaniu miocytów [174]. Funkcje białek powstających z kolistych RNA są często zbieżne z funkcjami białek kodowanych przez liniowe transkrypty rodzicielskie, jednak w związku z tym, że często są one dużo krótsze mogą też pełnić inne, czasem przeciwstawne role. Dla przykładu circ-FBXW7 koduje białko o długości 185 aminokwasów, które może konkurować z białkiem pochodzącym z mRNA o wiązanie z białkiem USP28 (ang. *Ubiquitin specific peptidase 28*) i promować w ten sposób degradację białka c-Myc [175]. Odkryto również interesujące zjawisko polegające na tym, iż niektóre białka kodowane przez koliste RNA mogą wpływać na heterodimeryzację białek pochodzących z ich liniowych odpowiedników, powodując utratę ich funkcjonalności [176,177]. Zgoła odmiennie działanie wykazała mikroproteina kodowana przez circSHPRH, która działa ochronnie i zmniejsza degradację analogicznego białka o pełnej długości, w ten sposób zwiększając ekspresję swojego liniowego odpowiednika [178]. Obecnie próbuje się wykorzystać potencjał kodowania białek przez koliste RNA, ze względu na ich wysoką stabilność i odporność na degradację. Syntetyczne circRNA mają potencjał stworzenia efektywnej platformy ekspresyjnej, co czyni je jeszcze bardziej interesującymi potencjalnymi cząsteczkami terapeutycznymi [179]. Uproszczony schemat potencjalnych funkcji kolistych RNA oraz ich relacje z innymi cząsteczkami przedstawione zostały schematycznie na rycinie numer 3.



Rycina 3. Uproszczony schemat relacji między kolistymi RNA a białkami, mRNA oraz miRNA.

1.3.5. Profil ekspresji kolistych RNA

Rozwój sekwencjonowania nowej generacji, a także powstanie licznych baz danych, umożliwiło dokładne określenie profilu ekspresji kolistych RNA w różnych tkankach, co z kolei było podstawą do ustalenia przestrzennych i czasowych wzorców ekspresji tych cząsteczek. W 2013 roku Salzman i współpracownicy odkryli, iż circRNA wykazują wysoką specyficzność komórkową. Ponadto ustalili, że poziom ekspresji tych cząsteczek w różnych tkankach różni się na poszczególnych etapach rozwoju [180]. Ustalono, iż prawie 12 % kolistych RNA u człowieka oraz ponad 34 % kolistych RNA u myszy jest specyficznych tkankowo [181]. Wskaźnik ten jest porównywalny do wskaźnika tkankowo specyficznych mRNA, jednak zdecydowanie wyższy niż w przypadku lncRNA [182]. Przełomowym okazały się badania prowadzone przez Rybak-Wolf i współpracowników, które dowiodły, że mózg jest bardzo bogaty w koliste RNA, a większość (> 90 %) znanych circRNA można wykryć w tkankach mózgu człowieka lub myszy. Ponadto wiele circRNA ulegało ekspresji tylko w mózgu, co wskazywało na ważną rolę kolistych RNA w funkcjonowaniu tego organu [117,183].

Dzięki szeroko zakrojonym badaniom udało się ustalić, iż koliste RNA biorą udział nie tylko w rozwoju stanów patologicznych, ale również pełnią funkcjonalną rolę w procesach fizjologicznych. TSCD (ang. *Tissue-Specific CircRNA Database*) to obszerna baza danych na temat specyficznych tkankowo kolistych RNA, która szczegółowo opisuje profil ekspresji tych cząsteczek u dorosłego człowieka, ludzkiego płodu oraz myszy [181]. Uważa się, iż koliste RNA są w dużej mierze związane z rozwojem i różnicowaniem się tkanek – niektóre z nich posiadają podobny poziom ekspresji w różnych narządach, jednak spora ich grupa ulega ekspresji na różnym poziomie w różnych tkankach [184]. Jak zostało to już opisane wcześniej, najwyższy poziom ekspresji circRNA obserwuje się w mózgu, ale również w wątrobie oraz sercu w porównaniu do innych tkanek. Ponadto zauważalny jest trend podwyższenia poziomu ekspresji klastrów circRNA pochodzących z liniowych odpowiedników związanych z biologicznymi funkcjami danego organu. Dla przykładu – koliste RNA o wysokim poziomie ekspresji w mózgu pochodzą z mRNA kodujących białka związane z transmisją synaptyczną oraz różnicowaniem i dojrzewaniem neuronów [185]. Podobnie w wątrobie obserwuje się wysoką ekspresję circRNA, których liniowe odpowiedniki odpowiedzialne są za udział w cyklu ornitynowym [186].

Coraz więcej dowodów wskazuje również na to, że warunki stresowe, takie jak wysoka temperatura lub stres oksydacyjny, mogą zmieniać profil ekspresji kolistych RNA, co związane może być z czynnikami wiążącymi się do sekwencji intronowych. Wykazano, że białka takie jak ADAR mogą modulować ekspresję kolistych RNA podczas stresu retikulum endoplazmatycznego [187,188]. Co więcej, sekwencjonowania RNA wykazały, iż poziom ekspresji circRNA znacznie zwiększa się wraz z wiekiem, co związane może być z kilkoma mechanizmami. Po pierwsze circRNA są odporne na degradację i cechują się wysoką stabilnością co może prowadzić do ich akumulacji w starzejących się komórkach. Po drugie podczas procesów starzenia się dochodzi do kaskady zmian w procesie splicingu, co może promować powstawanie kolistych cząsteczek RNA. Postuluje się również udział różnych białek, które mogą brać udział w zwiększonej produkcji circRNA podczas procesów starzenia [189].

Istnieje także grupa kolistych RNA, które posiadają specyficzny poziom ekspresji w nowotworach, a wiedza o nich została podsumowana w specjalnej bazie danych CSCD (ang. *Cancer-Specific CircRNA Database*). Było to podstawą do dokładniejszego zbadania roli tych cząsteczek w kancerogenezie i umożliwiło ustalenie wzorca ekspresji circRNA w różnego rodzaju guzach [190].

1.3.6. Koliste RNA w nowotworach

Dzięki bazie danych CSCD możliwe było ustalenie profilu ekspresji kolistych RNA w nowotworach w porównaniu do odpowiadającym im zdrowym tkankom. W większości nowotworów poziom ekspresji circRNA ulegał obniżeniu, co związane z negatywną korelacją między poziomem kolistych RNA a tempem proliferacji, które w przypadku komórek nowotworowych jest bardzo wysokie [186]. Obserwuje się jednak też nowotwory, takie jak rak piersi czy szyjki macicy, w przypadku których większa liczba kolistych RNA posiada zwiększony poziom ekspresji w porównaniu do zdrowych tkanek [191-193].

Udział kolistych RNA w nowotworzeniu można wyjaśnić w trzech różnych aspektach. Po pierwsze circRNA może ulegać ekspresji wyłącznie w komórkach nowotworowych na skutek translokacji chromosomowych, które są dość często występującym zjawiskiem w kontekście kancerogenezy. Guarnerio i współpracownicy w swoim badaniu opisali nowo powstały kolisty RNA, który brał udział w rozwoju białaczki promielocytowej, a jego występowanie związane było z najczęściej występującą w tym nowotworze translokacją [194]. Kolejny mechanizm zakłada, iż w nowotworach może dochodzić do obniżenia poziomu ekspresji antyproliferacyjnych kolistych RNA, które bezpośrednio lub pośrednio biorą udział w mechanizmach związanych z supresją nowotworu. Natomiast trzeci aspekt związany jest ze zwiększeniem poziomu ekspresji kolistych RNA promujących rozwój nowotworu, co jest szczególnie interesujące w kontekście potencjalnego wykorzystania tych cząsteczek jako biomarkerów rozwoju poszczególnych nowotworów [195,196].

W 2011 roku Hannah i Weinberg zdefiniowali osiem najważniejszych cech komórek nowotworowych:

- proliferacja niezależna od sygnałów regulujących podziały komórki,
- brak reakcji na czynniki hamujące proliferację,
- brak programowanej śmierci komórki,
- nieśmiertelność replikacyjna,
- angiogeneza,
- aktywacja procesów naciekania i przerzutowania,
- niestabilność genomu,
- stan zapalny sprzyjający powstawaniu nowotworu,
- zmiany metabolizmu energetycznego,
- „ucieczka” od mechanizmów „nadzoru” immunologicznego [197]

Każda z tych cech związana jest z kaskadą wieloczynnikowych szlaków molekularnych, w których udział mogą brać koliste RNA [198]. W przypadku udziału w utrzymywaniu proliferacji komórek nowotworowych najlepiej zbadanych kolistym RNA jest circFOXO3, którego poziom ekspresji w różnych nowotworach jest obniżony. Ten circRNA może regulować procesy związane z proliferacją poprzez różne mechanizmy. Może on wchodzić w interakcję z białkiem p53, a także tworzyć kompleks z p21-CDK2 (ang. *Cyclin dependent kinase 2*) co powoduje zahamowanie cyklu komórkowego [157,199]. Ponadto Wang i współpracownicy wykazali, iż hsa_circ_0014717, którego poziom jest obniżony w raku jelita grubego. może hamować proces kancerogenezy poprzez stymulację ekspresji inhibitora kinazy zależnej od cyklin p16 [200]. Ciekawym przykładem udziału circRNA w braku reakcji na czynniki hamujące proliferację może być circZKSCAN1, który w przypadku raka wątroby razem ze swoim liniowym odpowiednikiem cechuje się obniżonym poziomem ekspresji, a rolą obu tych transkryptów jest supresja proliferacji [201]. Podobnie, w przypadku tego samego nowotworu, circMTO1 wykazywał supresyjne działanie poprzez wiązanie onkogenego miR-9, a co za tym idzie promowanie ekspresji inhibitora kinazy zależnej od cyklin p21 [202].

Li i współpracownicy wskazali, iż zwiększona ekspresja circBRC4 może modulować apoptozę komórek poprzez szlak związany z miR-101 w raku pęcherza, natomiast w przypadku niedrobnokomórkowego raka płuca circHIPK2 hamuje mechanizmy związane z programowaną śmiercią komórki poprzez interakcję z miR-149 [203,204].

Telomery, to struktury ochronne, które zabezpieczają końce liniowych chromosomów zachowując w ten sposób stabilność genomu. Są one głównymi czynnikami wpływającymi na nieśmiertelność replikacyjną, ponieważ w warunkach fizjologicznych, wraz z podziałami komórek ulegają one skracaniu, do momentu osiągnięcia krytycznej długości, co powoduje trwałe zatrzymanie cyklu komórkowego. Maksymalna liczba podziałów, przez które może przejść każda zdrowa komórka nazwany został limitem Hayflicka. Nie dotyczy on jednak komórek nowotworowych, w przypadku których enzym odpowiedzialny za wydłużanie telomerów – telomeraza często ulega mutacjom, które wpływają na jej zwiększoną aktywność [205]. W kontekście regulacji nieśmiertelności replikacyjnej odkryto, iż hsa_circ_0020397 w raku jelita grubego bierze udział w tym procesie poprzez interakcję z miR-138, który z kolei wpływa na poziom ekspresji odwrotnej telomerazy [206].

Istnieje również wiele doniesień na temat roli kolistych RNA w angiogenezie. W związku z tym, iż proces ten jest nierozzerwalnie związany z hipoksją, Noeckel i

współpracownicy zidentyfikowali koliste RNA, których poziom ekspresji ulegał modyfikacji w warunkach niedoboru tlenu. Spośród nich circZNF292 okazał się cząsteczką promującą rozwój naczyń krwionośnych poprzez pobudzanie rozwoju komórek endotelialnych [207]. W przypadku raka piersi odkryto, iż circMYLK może promować angiogenezę poprzez modulację ścieżki sygnalizacyjnej związanej z VEGFA/VEGFR2 (ang. *Vascular endothelial growth factor A/ Vascular endothelial growth factor receptor 2*) [208].

Wiele kolistych RNA bierze udział w procesie inwazji, który w dużej mierze decyduje o stopniu złośliwości nowotworu. Wykazano, iż circCCDC66 wpływa na tempo inwazji w przypadku nowotworu jelita grubego, z kolei w przypadku circBRAF zaobserwowano wpływ na inwazję w gruczolakoraku trzustki [209]. Dokładne mechanizmy związane z promowaniem EMT przez koliste cząsteczki często pozostają jednak nieznane, a obserwowany jest jedynie efekt funkcjonalny związany z manipulacją poziomu ekspresji badanego circRNA [209,210].

W przypadku nowotworów mutacje genomu oraz jego niestabilność decydują o rozwoju oraz agresywności guza. Badania wskazują, że i na tym poziomie koliste RNA mogą pełnić ważne funkcje. Modyfikacje m6A circNSUN2 w raku jelita grubego wzmacnia jego transport do cytoplazmy, gdzie razem z białkiem IGF2BP2 (ang. *Insulin-like growth factor 2 mRNA-binding protein 2*) formuje on kompleks wpływający na stabilność mRNA HMGA (ang. *High-mobility group A*). HMGA bierze udział w utrzymywaniu stabilności genomu, więc oddziaływanie to w rezultacie promuje powstawanie przerzutów [211].

Stan zapalny jest kolejnym elementem sprzyjającym rozwojowi nowotworu [212,213]. Koliste RNA mogą regulować komórki odpornościowe, które następnie wpływają na inicjację stanu zapalnego w mikrośrodowisku guza. W nowotworze wątroby zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji circARSP91, które wzmacnia nadzór immunologiczny komórek NK (ang. *Natural killer*) [214,215]. Ponadto udowodniono, iż hsa_circ_0005519 może wpływać na ekspresję cytokin prozapalnych IL-12 i IL-6 (ang. *Interleukin*), a hsa_circ_0012919 bierze udział w epigenetycznej regulacji czynnika martwicy nowotworu TNF (ang. *Tumor necrosis factor*) [214].

Jak wspomniano wcześniej, metabolizm komórek nowotworowych jest w dużej mierze zależny od glikolizy. Ten fenomen pozwala komórkom nowotworowym napędzać reakcje anaboliczne, takie jak biosynteza kwasów nukleinowych, lipidów i aminokwasów niezbędne przy wysokim tempie proliferacji. Jednym z ważnych elementów całej tej komórkowej kaskady energetycznej jest kinaza białkowa aktywowana przez AMP (AMPK,

ang. *5' AMP-activated protein kinase*). Li i współpracownicy dowiedli, iż circACC1 bierze udział w składaniu i aktywacji kompleksu AMPK w raku jelita grubego, podobnie jak circMAT2B w przypadku raku wątroby [216,217].

Ostatnim aspektem wpływającym na rozwój nowotworu jest zdolność do osłabienia oraz ucieczki spod nadzoru układu odpornościowego. W kontekście kolistych RNA zaobserwowano, iż circFGFR1 może oddziaływać z miR-381, podnosząc w ten sposób poziom ekspresji jego docelowego mRNA – CXCR4 (ang. *C-X-C Chemokine receptor type 4*), co skutkuje rozwojem oporności na immunoterapię opartą o przeciwciała skierowane przeciwko receptorowi programowanej śmierci PD-1 (ang. *Programmed cell death protein 1*) [218].

Wymienione przykłady udziału kolistych RNA w mechanizmach związanych z rozwojem przez komórki fenotypu nowotworowego stanowią jedynie niewielką część dotąd zbadanych interakcji tych cząsteczek z elementami molekularnych ścieżek związanych z nowotworzeniem. Ogromna liczba coraz to nowszych doniesień związanych z ważną rolą kolistych RNA w kancerogenezie wskazuje na istotność ich dalszego badania, szczególnie w kontekście nowotworów, w przypadku których aktualne standardy leczenia nie przynoszą oczekiwanych rezultatów. Dlatego też poszukiwanie nowych celów terapeutycznych oraz dokładniejsze zrozumienie mechanizmów odpowiedzialnych za ich wysoką złośliwość może być przełomowe [219].

1.3.6.1. Koliste RNA w GBM

Dzięki istnieniu baz danych podsumowujących dotychczasową wiedzę o profilu ekspresji oraz sekwencji kolistych RNA, a także dzięki rozwojowi wysokoprzepustowego sekwencjonowania oraz narzędziom bioinformatycznym udoskonalamy wykrywanie tych cząsteczek, możliwym stało się jeszcze dokładniejsze zbadanie profilu ich ekspresji w problematycznych oraz niezwykle złośliwych nowotworach. Jest to niezwykle ważne, nie tylko z naukowego punktu widzenia, ale również z perspektywy poszukiwać nowych potencjalnych biomarkerów, a także celów terapeutycznych [220].

W 2019 Josh Vu oraz współpracownicy przeprowadzili dogłębną analizę, która wykazała złożony profil ekspresji circRNA związanych z nowotworami w ponad 2000 próbek pochodzących z guzów raka płuca, tarczycy, piersi oraz pęcherza [221].

Jednym z przełomowych badań w kontekście kolistych RNA w GBM było to przeprowadzone przez Songa i współpracowników, w którym przedstawione zostało nowatorskie podejście do detekcji circRNA przez wykorzystanie narzędzia UROBORUS uwzględniającego identyfikację miejsc BSJ. W swojej pracy przedstawili oni dane z sekwencjonowania 46 guzów glejaka oraz próbek zdrowego mózgu [222].

W 2017 Zhu i współpracownicy opublikowali dane z analizy różnicowej ekspresji circRNA na podstawie sekwencjonowania RNA z 5 guzów pobranych od pacjentów chorujących na GBM oraz 5 próbek zdrowego mózgu. Pośród ponad 1400 deregulowanych circRNA zidentyfikowali oni 1205 circRNA o obniżonym profilu ekspresji i 206 o podwyższonym. Odkryli także, że poziom ekspresji circBRAF był zdecydowanie niższy w guzach o wyższym stopniu złośliwości (stopień III i IV według WHO) niż w próbkach guza o niższym stopniu złośliwości (stopień I i II według WHO) [223]. Otworzyło to nowe perspektywy poszukiwań cząsteczek zaangażowanych w rozwój oraz progresję glejaka wielopostaciowego.

Koliste RNA mogą wpływać na zdolność komórek GBM do proliferacji poprzez regulację ekspresji genów zaangażowanych w ten proces lub poprzez oddziaływanie z elementami ścieżek sygnałowych. Ekspresja hsa_circ_0074027 jest w GBM znacznie podwyższona oraz powiązana z jego cechami klinicznymi. Promuje on ekspresję IL17RD (ang. *Interleukin 17 receptor D*) poprzez wiązanie się z miR-518a-50, co z kolei wpływa na zwiększone tempo proliferacji komórek [224]. CircPITX1, którego poziom ekspresji w glejaku jest także podwyższony, wpływa na wzrost guza związany z proliferacją poprzez wiązanie miR-584, który wpływa na poziom ekspresji KPNB1 (ang. *Karyopherin Subunit Beta 1*) [225].

Inwazja oraz przerzuty komórek glejaka to złożony i dynamiczny proces, który polega na przebudowie cytoszkieletu oraz zmianach w mikrośrodowisku guza. Ważnym mechanizmem odpowiedzialnym za to zjawisko jest EMT, w którym dochodzi do utraty polarności komórek, przerwania połączeń między nimi oraz nabycia przez nie potencjału migracyjnego. Nadekspresjonowany w GBM circPARP4 może wpływać na EMT poprzez oddziaływanie z miR-125a, co zwiększa żywotność komórek oraz wzmaga ich przemieszczanie się [226]. Ogromne znaczenie w procesie EMT mają metaloproteiny, które są zależnymi od cynku enzymami proteolitycznymi, których zadaniem jest przebudowa i degradacja macierzy zewnątrzkomórkowej. CircMMP9, którego poziom ekspresji w GBM jest wyraźnie zwiększony, ma wpływ nie tylko na proliferację, ale również i na migrację komórek. Jego biogeneza jest regulowana przez eIF4A3 (ang. *Eukaryotic initiation factor*

4A3), który przez wiązanie się z mRNA MMP9 (ang. *Metalloproteinase 9*) promuje powstawanie kolistego transkryptu. CircMMP9 wiąże cząsteczki miR-124 przez co wpływa na zwiększone tempo proliferacji, ponieważ zapobiega obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów CDK4 (ang. *Cyclin-dependent kinase 4*) oraz AURKA (ang. *Aurora kinase A*), które są w fizjologicznych warunkach celami miR-124. Ponadto circMMP9 stabilizuje liniowy transkrypt MMP9, którego główną rolą jest degradacja kolagenu typu IV, będącego głównym składnikiem błony podstawnej oraz rusztowania macierzy zewnątrzkomórkowej [227,228].

Co ciekawe, wykazano również, że circRNA wpływają na progresję GBM poprzez regulację neowaskularyzacji GBM. Neowaskularyzacja jest ściśle związana z szybkim rozwojem GBM, gdyż glejaki o wysokim stopniu złośliwości uznawane są za jedne z najbardziej unaczynionych guzów [229]. W kontekście tego procesu, odkryto, iż circPOSTN powoduje zwiększenie poziomu ekspresji naczyniowo-śródbłonkowego czynnika wzrostu VEGFA, poprzez wiązanie miR-219a. Ponadto circSMARCA wpływa na regulację splicingu mRNA VEGFA poprzez wiązanie SRSF1 i reguluje w ten sposób tempo powstawania nowych naczyń krwionośnych w obrębie guza [230].

CircRNA mogą również wpływać na subpopulację komórek macierzystych glejaka. Gao i inni wykazali, że circ-E-cadherin koduje 14 aminokwasowy peptyd, który łączy się z domeną strukturalną CR2 receptora EGFR i aktywuje szlak sygnalizacyjny EGFR-STAT3, utrzymując tym samym agresywny fenotyp GSC [231]. Wykazano, iż ramka odczytu circEGFR nie zawiera kodonu stopu, co skutkuje ciągłą translacją białka, składającego się z powtarzającej się sekwencji aminokwasów, zwanego rtEGFR, który wpływa na agresywność GBM, wzmacniając onkogenne działania EGFR, poprzez jego stabilizację [232]. Z drugiej strony, niektóre circRNA, takie jak circAKT3, circFBXW7 czy circLINC-PINT kodują białka, które pełnią rolę w supresji rozwoju GBM. Większość z nich działa poprzez funkcję molekularnej „gąbki” dla różnych microRNA lub innych białek [175,233,234].

Rozwój oporności na temozolomid jest kolejnym istotnym zjawiskiem warunkującym wysoką złośliwość komórek GBM i także w tym procesie mogą brać udział koliste RNA. Rao i współpracownicy odkryli, iż poziom ekspresji circASAP1 w komórkach GBM opornych na temozolomid jest podwyższony, a jego nadekspresja promuje rozwój oporności na TMZ. Ponadto, obniżenie poziomu ekspresji tego circRNA w modelu mysim, przywróciło wrażliwość komórek na ten chemioterapeutyk, co jest prawdopodobnie spowodowane

wiązaniem miR-502, co z kolei wpływa na ekspresję NRAS (ang. *Neuroblastoma RAS viral oncogene homolog*) [235].

Badania wykazały, że poziomy ekspresji circRNA mogą korelować z różnymi cechami kliniczno-patologicznymi GBM, w tym wielkością guza, stopniem złośliwości i zaawansowania oraz prawdopodobieństwem nawrotu. Stwierdzono, że ekspresja hsa_circ_0029426 jest skorelowana z wielkością guza i klasyfikacją WHO [236]. Ponadto odkryto, iż ekspresja circEPB41L5 koreluje z wiekiem, liczbą zmian, zmianami martwiczymi, nawrotem i przeżyciem u pacjentów z GBM [237]. W ostatnich latach próbuje się również wykorzystać circRNA do oceny rokowania u pacjentów z GBM poprzez korelację poziomu ekspresji kolistych RNA ze wskaźnikiem przeżycia całkowitego (OS, ang. *Overall survival*). Liu i współpracownicy określili, że poziom circCDC45 w GBM jest ściśle związany ze złym rokowaniem dla pacjentów [238]. Badacze poszukują również kolistych RNA, które mogłyby służyć za biomarkery GBM w krwi. Odkryto, że komórki glejaka odporne na promieniowanie wydzielają znacznie ilości kolistych RNA znajdujących się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, spośród których wyselekcjonowano circATP8B4, który przez wiązanie miR-766 w znaczny sposób wpływa na rozwój radiooporności [239]. Ze względu na różnorodny i szeroki zakres funkcji, wysoką stabilność i obecność w płynach ustrojowych, circRNA uważane są za cenne potencjalne biomarkery oraz cele terapeutyczne w GBM, jednak obszar ten nadal wymaga dogłębnych badań i dalszych analiz [240].

2. Materiały i metody

2.1. Ważniejsze odczynniki chemiczne oraz gotowe zestawy odczynników

Tabela 4. Lista ważniejszych odczynników.

Nazwa odczynnika	Producent oraz numer katalogowy
Trizol TRI Reagent® Solution	Invitrogen, AM9738
Chloroform	POCH, 234430427
2-Propanol (Izopropanol)	Sigma-Aldrich, 563935
EtOH	POL-AURA, 113964200#10L
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	ThermoFisher Scientific, S33102
Agaroza	Sigma-Aldrich, A9539-500G
DNA Gel Loading Dye (6X)	ThermoFisher Scientific, R0611
Tris-HCl pH 7.5	ThermoFisher Scientific, 15567027
Kwas borowy	POCH, 531360738
Matrigel	Corning, 356234
Geltrex	ThermoFisher Scientific, A1569601
Akutaza StemPro	ThermoFisher Scientific, A1110501
Trypsyna	Sigma-Aldrich, T4049-100ML
PBS	Millipore, 524650-1EA
TGFβ	ThermoFisher Scientific, PHG9214
EDTA (kwas wersenowy)	POCH, 593280117
RNaza R	Lucigen, RNR07250
Medium do mrożenia Cryo-SFM	Sigma-Aldrich, C-29912
Bufor do przechowywania tkanek MACS® Tissue Storage Solution	Miltenyi Biotec, 130-100-008
NP40	ThermoFisher Scientific, 85124
Tween-20	Sigma-Aldrich, P9416-50ML
Glicyna	Pol-Aura, PA-03-2385-M#1KG
SDS (Dodecylosiarczan sodu)	Pol-Aura, PA-13-BP166#500GR
Tris	ThermoFisher Scientific, 17926
Formamid	ThermoFisher Scientific, 17899
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich, S6546
Chlorek magnezu	Sigma-Aldrich, 63069
DTT	ThermoFisher Scientific, P2325
4 x Protein Loading Buffer	Eurx, E0268-01
APS	POL-AURA, PA-07-32708
Temed	POL-AURA, PA-13-BP150
Akrylamid/Bis-akrylamid, 37,5:1, 30 %	POL-AURA, PA-03-4329-E#100ML
PageRuler Plus Prestained Protein Ladder,	ThermoFisher Scientific, 26619
Pierce ECL Western Blotting Substrate	ThermoFisher Scientific, 32106
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, SM0311
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	ThermoFisher Scientific, SM0322
GoTaq G2 Master Mix, 2x	Promega, M7822
Przeciwciało anti-ATXN10	Sigma-Aldrich, HPA049531
Przeciwciało drugorzędowe przeciw mysim IgG	Sigma-Aldrich, A9044

sprzężone z peroksydazą	
Przeciwciało drugorzędowe przeciw króliczym IgG sprzężone z peroksydazą	Sigma-Aldrich, A6154
Przeciwciało anty-GAPDH sprzężone z peroksydazą	Santa Cruz Biotechnology, sc-47724

Tabela 5. Lista ważniejszych gotowych zestawów.

Nazwa zestawu	Producent oraz numer katalogowy
DNA-free™ DNA Removal Kit	ThermoFisher Scientific, AM1906 I
Transcriptor High-Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche, 04379012001
GeneJET Plasmid Maxiprep Kit	ThermoFisher Scientific, K0491
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix	Roche, 04707516001
In-Fusion® HD Cloning Plus PCR Cloning Kits	Takara Bio, 6389
BCA Protein Assay Kit	ThermoFisher Scientific, J63283
DNA Gel Loading Dye (6X)	ThermoFisher Scientific, R0611

2.2. Bufory i pożywki wykorzystane w pracy

Bufor TEB 10x pH 8,3

- 500 mM Tris-HCL
- 500 mM kwas borowy
- 10 mM EDTA

Bufor do rozdzielania elektroforetycznego białek (1L)

- 144 g glicyna
- 30,2 g Tris-HCl
- 10 g SDS

Bufor do transferu białek

- 25 mM Tris-HCl
- 190 mM glicyna
- 20 % metanol

Bufor TBS (1L)

- 24 g Tris-HCl
- 5,6 g Tris
- 8,76 g Chlorek sodu

Bufor do blokowania membrany po transferze Western Blot

- 5 % mleko w proszku
- 1x TBS
- 1% Tween20

Bufor do płukania membran Western Blot

- 1x TBS
- 1 % Tween20

Bufor do lizy - „pulldown”

- 50mM Tris-HCl pH 7,5
- 150 mM NaCl
- 3 mM MgCl₂
- 0,5 % NP40
- 2 mM EDTA
- 1mM DTT

Bufor do hybrydyzacji (2x) - „pulldown”

- 100 mM Tris-HCl pH 7,5 Tris-HCl pH 7,5
- 300 mM NaCl
- 1 mM MgCl₂
- 0,2 % SDS
- 15 % Formamid
- 0,5 % NP40
- 10 mM EDTA
- 1 mM DTT

Pożywka LB płynna

- 1 % baktotrypton
- 0,5 % ekstrakt drożdżowy
- 0,5 % NaCl

Pożywka LB stała

- 1 % baktotrypton
- 0,5 % ekstrakt drożdżowy
- 0,5 % NaCl
- 1,5 % agaroz

2.3. Oligonukleotydy

Tabela 6. Sekwencje oligonukleotydów.

Nazwa	Sekwencja startera F (5'→3')	Sekwencja startera R (5'→3')
HPRT	TGACCTTGATTTTGCATACC	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCCT
N-kadheryna	GCCCAAGACAAAGAGACCCA	GCTGACTCCTTCACTGACTCC
SNAIL2	GACCCTGGTTGCTTCAAGGA	TGTTGCAGTGAGGGCAAGAA
Zeb1	GCACCTGAAGAGGACCAGAG	TGCATCTGGTGTTCATTTT
OCT4	GTGGAGAGCAACTCCGATG	TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC
SOX2	CGAGTGGAACCTTTTGTCGGA	TGTGCAGCGCTCGCAG
Nanog	ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC	TTTTTGCGACACTCTTCTCTGC
CADPS2_L	ATTGCCACTCCCATAACCAGC	GCAGGAGATGCCTGGTTCAT
CADPS2_C	GAAGTCAGTTGCTCCCAATCG	GTTCCCTTCTGATCTGGGCT
EPB41L5_L	CATGCTTTCTTCCGCCTTCG	GCCTGTTGGGAGCCATTACT
EPB41L5_C	GGGCCTGTAGCTGGAATACG	TCCATAGTGTGATGCCCCA
UNC13_L	GAGATGTGGCCATGACCCTG	CACTTCATGCCTTGCCTTGC
UNC13_C	AAGCAAATGGCAGAGTTGGAAG	CAAACCAGAAGCAAAGCTCCA
USP45_L	GACTTTTCTGGAAGCGTCGTG	GACTTTTCTGGAAGCGTCGTG
USP45_C	AAATATTCATCAACCTAGAGCTGCC	GGCCTTTTACTTCTTTTGGCTTTCT
ARID1A_L	AGCCGAATCTCATGCCTTCC	GCCGCTTGTAATTCTGCTGTT
ARID1A_C	CCAGTAAGGGAGGGCAAGAAG	CTGTTGCTGCGAGTATGGGT
GUSBP1_L	AAAACACTGGGGCTGGTGAAT	TGTTTCGTGCATCAGGTACGG
GUSBP1_C	CGTGTATGGAGTGGAACGC	GCCTGGTTGTCCACGACTTT
PLOD2_L	CATGGACACAGGATAATGGCTG	AGGGGTTGGTTGCTCAATAAAAA
PLOD2_C	AGTATTGGAGGGGGCCAGAA	GGAATCCATCACTTTCTTTTGTGTC
VCAN_L	AGGTGGTCTACTTGGGGTGA	CGATGGTTGTAGCCTCTTTAGGTTT
VCAN_C	AGAAGCTGCAGAAGCTAGG	AACATCAGGCTCACCACCTG
EGFR_L	GACAGGCCACCTCGTCG	TCGTGCCTTGGCAAACCTTC
EGFR_C	AAACAACACCCTGGTCTGGA	GGGTGGCACTGTATGCACTC
HLA-B_L	ATGGCGAGGACCAAACCTCAG	CACAACCTGCTAGGACAGCCA
HLA-B_C	TGGCTGTCTGTTGTCTAGC	CACCCCCACCACTTACACGCA
circInter6p22	GCCTCTCACAGGACGTTTTT	GCCCAACACCCAACACACAT
r18S	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	CATTCTTGGCAAATGCTTTTCG
miR-576	ATTCTAATTTCTCCACGTCTTT	
miR-1238	CTTCCTCGTCTGTCTGCCCC	
EIF4A3	AAGGGAGAGATGTCATGCAC	GCTTGAGTTTCACGAACCTGA
FUS	ATGGCCTCAAACGATTATACCCA	GTAACCTCTGCTGTCCGTAGGG
PDK1	CTGTGATACGGATCAGAAACCG	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT
GLUT1	TTGCAGGCTTCTCCAACCTGGAC	CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG
ANG	CTGGGCGTTTTGTTGTTGGTC	GGTTTGGCATCATAGTGCTGG
FN1	ACAACACCGAGGTGACTGAGAC	GGACACAACGATGCTTCTGAG
GAPDH intron	GTCCCCAGAAACAGGAGGTC	AAGAAAGCGTCCCCACCTA
GAPDH egzon-egzon	GAAAGCCTGCCGGTGACTAA	GCCCAATACGACCAAATCAGAGA

2.4. Hodowla komórkowa

2.4.1. Linie komórkowe

Linie komórkowe GBM użyte w eksperymentach wraz z warunkami ich hodowli zostały przedstawione w tabeli numer 7.

Tabela 7. Lista komórek GBM oraz warunki ich hodowli.

Nazwa	Producent	Warunki hodowli	Medium suplementowane (producent oraz numer katalogowy)
U251-MG	American Type Culture Collection (ATCC)	5 % CO ₂ , 37°C, 95 % wilgotności	Eagle's Minimum Essential Medium EMEM (LGC Standards, ATCC-30-2003) + 10 % FBS (EURx, E5050) + 500 µl roztworu penicyliny/streptomycyny 100x (ThermoFisher Scientific, 10378016)
U138-MG			
U87-MG			

2.4.2. Kultury *in vitro*

Eksperymenty z wykorzystaniem hodowli komórkowych przeprowadzono w sterylnych warunkach, z wykorzystaniem komory z laminarnym przepływem powietrza. W celu namnożenia komórek, adherentne linie hodowano w butelkach o powierzchni 75 cm² i 25 cm² w odpowiednio 10 ml i 5 ml właściwej suplementowanej pożywki, do momentu osiągnięcia ok. 80 % konfluencji. Komórki przechowywano w inkubatorze w temperaturze 37°C i atmosferze 5 % CO₂. Pożywkę wymieniało się na świeżą co 48 h, a w celu odklejenia komórek od dna, hodowlę przemywano sterylnym buforem PBS, a następnie dodawano do nich 2 ml roztworu trypsyny i inkubowano 5 minut w 37°C. Po inkubacji całość inaktywowano poprzez dodanie 4 ml suplementowanej pożywki, a komórki wirowano przez 3 minuty przy 1500 rpm w temperaturze pokojowej. Supernatant zlewano, a osad zawieszano w świeżej pożywce i przenoszono do nowego naczynia hodowlanego. Liczbę komórek liczono przy użyciu automatycznego licznika Luna II (Logos Biosystems). Po zakończeniu hodowli komórki mrożono w odczynniku Cryo-SFM i przechowywano w ciekłym azocie. W przypadku eksperymentów wykonywanych na płytkach komórki wysiewano według tabeli numer 8.

Tabela 8. Liczba komórek wysiewanych na płytce wielodołkowej.

Wielkość płytki	Liczba komórek	Objętość pożywki
Płytki 96-dołkowa	1 x 10 ⁴	0,2 ml
Płytki 6-dołkowa	2 x 10 ⁵	2,5 ml

2.4.3. Sfery

Neurosferę z linii komórkowych GBM hodowano zgodnie z protokołem opracowanym przez Vinci i współpracowników [241]. Komórki wysiewano na płytkach 6-dołkowych w liczbie podanej w tabeli numer 8, w specjalnie przygotowanym medium do neurosfer, którego skład zawarty został w tabeli numer 9. Pożywkę przed samym użyciem suplementowano dodatkowo 0,7 µl EGF/1 ml i 0,7 µl FGF/1ml. Pasaż przeprowadzano w momencie osiągnięcia przez neurosferę wielkości powyżej 200 µm z użyciem akutazy (2 ml na komórki zebrane z całej płytki 6-dołkowej), inkubację prowadzono w 37°C przez 10 min, następnie wirowano przez 3 min w 300 rcf, zlewano supernatant, a komórki przenoszono do świeżej pożywki.

Tabela 9. Składniki pożywki do hodowli neurosfer.

Nazwa (producent oraz numer katalogowy)	Ilość (na 50 ml gotowej pożywki)
DMEM F12 (ThermoFisher Scientific, 11320033)	48 ml
B27 (ThermoFisher Scientific, 17504044)	1 ml
N2 (ThermoFisher Scientific, 17502048)	500 µl
Rozwrtór penicyliny/streptomycyny 100x ((ThermoFisher Scientific, 10378016)	500 µl

2.5. Tkanki glejaka pobrane od pacjentów oraz próbki zdrowego mózgu

Tkanki GBM uzyskano z Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu i Kliniki Neurochirurgii w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim im. J. Strusia w Poznaniu. Przed zebraniem tkanek uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Rady Naukowej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (nr zgody 534/18) oraz zgodę pacjentów. Pobrane podczas resekcji fragmenty guza zostały umieszczone w specjalnym buforze do przechowywania tkanek (MACS® Tissue Storage Solution), a następnie w ciągu kilku godzin przewiezione do laboratorium i zamrożone poprzez zanurzenie w ciekłym azocie. Tak przygotowane próbki były następnie opisane i przechowywane w -80°C. Zgromadzone próbki zostały użyte do izolacji RNA, który wykorzystano w sekwencjonowaniu RNA, a także dalszych analizach. Stężenie oraz jakość RNA zostało zmierzone za pomocą urządzenia Bioanalyzer 2100 firmy Agilent Technologies, dzięki czemu dla każdej próbki ustalony został współczynnik RIN (ang. *RNA Integrity Number*). Tabela numer 10 podsumowuje informacje z zebranych fragmentów guzów GBM, a

tabela numer 11 charakteryzuje próbki zdrowego mózgu, które były mieszaniną całkowitego RNA.

Tabela 10. Charakterystyka zgromadzonych próbek GBM pobranych od pacjentów.

Nazwa próbki	Płeć	Wiek	Symptomy		Lokalizacja guza (półkula)			Zakres resekcji		Wartość RIN
			Ból głowy	Afazja	Prawa	Lewa	Obie	Zupełna	Częściowa	
P01	Mężczyzna	59				X			X	8,1
P02	Kobieta	58	X			X		X		9
P03	Kobieta	56	X		X		X	X	X	9,2
P04	Kobieta	65			X				X	9,9
P05	Mężczyzna	63		X		X		X		9,4
P06	Mężczyzna	61			X			X		8,8
P07	Kobieta	58			X			X		8,2
P08	Mężczyzna	61				X		X		7,6
P09	Kobieta	63			X			X		8,7
P10	Mężczyzna	52	X		X			X		8,8
P11	Mężczyzna	62			X			X		8,4
P12	Mężczyzna	67	Brak informacji							8,5
P13	Mężczyzna	49	X	X		X		X		8,6
P14	Mężczyzna	60	X	X	X			X		7,8
P15	Kobieta	70	X				X		X	7,8
P16	Mężczyzna	83		X	X			X		9,3
P17	Mężczyzna	64					X	X	X	7,6
P18	Kobieta	74	X	X	X				X	8,5
P19	Mężczyzna	68			X			X		8,2
P20	Mężczyzna	65	X			X		X		7,4
P21	Kobieta	68		X	X				X	8,6
P22	Kobieta		Brak informacji							8,4
P23	Kobieta	58	Brak informacji							8
R1	Kobieta	52				X			X	7,5
R2	Mężczyzna	49		X		X		X		8,9
R3	Mężczyzna	47			X			X		7,7

Tabela 11. Charakterystyka próbek RNA ze zdrowego mózgu.

Nazwa	Producent	Numer katalogowy oraz LOT	Liczba próbek	Wartość RIN
First Choice Human Brain Reference RNA	Ambion	AM6050, LOT 1204014	23	9,1
FirstChoice® Human Brain Reference Total RNA	Ambion	6051, LOT 105P055201A	12	9
Human Brain Total RNA	Clontech	636530, LOT 1812054	3	8,2
Human Brain Total RNA	Takara	636530, LOT 1602002	3	8,8

2.6. Sekwencjonowanie RNA tkanek GBM oraz różnicowa analiza ekspresji circRNA

Przygotowanie bibliotek oraz sekwencjonowanie RNA wykonane zostało przez jednostkę Max Delbrück Center w Berlinie według protokołu producenta (Illumina, 20020594). Podczas przygotowania bibliotek, RNA został poddany rybodeplecji, a sekwencjonowanie wykonano z użyciem platformy HiSeq 4000 firmy Illumina w technologii krótkich odczytów sparowanych (ang. *Paired-end reads*) o długości 150 nukleotydów. Sekwencjonowaniu poddano 26 próbek RNA z fragmentów guzów pobranych od pacjentów chorych na GBM (guzy pierwotne n=24, guzy wtórne n=3) oraz 4 próbki złożone z mieszaniny RNA wyizolowanego ze zdrowych mózgow (n=41), które posłużyły jako kontrola. Odczyty przyrównane zostały do genomu ludzkiego GRCh37 v30 uzyskanego z bazy danych Gencode. Do identyfikacji kolistych RNA użyto narzędzia CIRI w wersji 2.0.6 i circMeta R, a różnicowa analiza ekspresji została wykonana za pomocą oprogramowania EdgeR [242,243]. Zastosowanymi kryteriami odcięcia były krotność zmiany $FC > 2$ (ang. *Fold change*) i wykrycie obecności circRNA w co najmniej 50 % analizowanych próbek. Ostateczna identyfikacja wykrytych circRNA została przeprowadzona z wykorzystaniem bazy danych circBase [118].

2.6.1. Różnicowa analiza ekspresji transkryptów białek wiążących RNA

W celu identyfikacji transkryptów białek wiążących RNA o zmienionym profilu ekspresji w GBM, odczyty z sekwencjonowania RNA zostały zmapowane do ludzkiego genomu (GRCh37 v30 od Gencode) za pomocą narzędzia Burrows-Wheeler Aligner [244]. Różnicowa analiza ekspresji przeprowadzona została przy użyciu testu glmQLFTest z pakietu

edgeR [243]. RBP zostały wybrane spośród genów o zmienionym poziomie ekspresji na podstawie listy RBP uzyskanej od Gerstberger i współpracowników [245].

2.6.2. Korelacja poziomu ekspresji transkryptów białek wiążących RNA i kolistych RNA posiadających potencjalne miejsca wiązania

W celu identyfikacji potencjalnych miejsc wiązania RBP z deregulowanymi w GBM circRNA, na początku sekwencje kolistych RNA zostały wyodrębnione za pomocą narzędzia FcircSEC a następnie przeprowadzono analizę miejsc wiązania (k-merów) między circRNA o zmienionym i niezmienionym profilu ekspresji [246]. Analiza k-merów (k=6) została wykonana za pomocą funkcji `kmer_compare` z pakietu `FeatureReachR` (<https://github.com/TaliaferroLab/FeatureReachR>). W kolejnym kroku 6-mery wzbogacone w deregulowanych circRNA zmapowano do miejsc wiązania RBP ustalonych na podstawie danych eCLIP (ang. *Enhanced Crosslinking Immunoprecipitation*) lub danych z RBNS (ang. *RNA Bind-n-Seq*) używając funkcji `estimate_motif_from_kmer` z pakietu `FeatureReachR` [247,248]. Analiza została następnie powtórzona dla regionów flankujących circRNA (o długości 1000 nt).

2.6.3. Stratyfikacja prób GBM w oparciu o ekspresję białek wiążących RNA

Analiza stratyfikacji próbek GBM, zgodnie ze zmianami w poziomach ekspresji transkryptów RBP, przeprowadzona została przy użyciu procedury CircIMPACT [249]. W pierwszym kroku wybrano podzbiór RBP zdolnych do klasyfikacji próbek GBM na dwie grupy w zależności od ich ekspresji, bez istotnego związku ze znanymi molekularnymi podtypami GBM (test χ^2 , wartość $p > 0,01$). Następnie przeprowadzono klastrowanie pacjentów w nowe podgrupy powiązane wspólnym wzorcem ekspresji RBP. W końcowym etapie przetestowano, które RBP wykazują istotne zmiany ekspresji między wcześniej zdefiniowanymi klastrami (test ANOVA jednoczynnikowy, wartości $p \leq 0,05$).

2.7. Izolacja całkowitego RNA oraz DNazowanie

Izolacja całkowitego RNA z tkanek pacjentów z GBM, z linii komórkowych oraz neurosfer została przeprowadzona przy użyciu odczynnika Trizol Reagent (Invitrogen) zgodnie z protokołem producenta. Komórki przemywano buforem PBS, a następnie do każdej próbki dodawano 500 μ l Trizolu i inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Tkanki GBM, ze względu na ich rozmiar, wymagały dodatkowego kroku homogenizacji mechanicznej. Uzyskane lizaty przenoszono do probówek typu Eppendorf o pojemności 2 ml,

do których dodawano 100 µl chloroformu i wytrząsano przez 15 sekund. Po 10 minutowej inkubacji wirowano przez 15 minut w 4°C przy 13000 rpm. Następnie górną frakcję przenoszono do nowych probówek o pojemności 1,5 ml i dodawano ekwiwalentną ilość izopropanolu w celu wytrącenia RNA. Próbkę inkubowano przez 15 minut w -20 °C i wirowano przy 13000 rpm w temperaturze 4 °C. Supernatant usuwano, a uzyskany osad przemywano 1 ml zimnego 80 % etanolu i krótko wortexowano. Próbkę wirowano przez 8 minut przy 7000 rcf w temperaturze 4°C. Osad osuszano w temperaturze pokojowej i zawieszano w 20 µl sterylnej wody. Stężenie wyekstrahowanego RNA mierzono spektrofotometrem NanoDrop 2000, a jego jakość ustalano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.

Próbki RNA przeznaczone do dalszych analiz poddawano trawieniu DNazą I za pomocą zestawu DNA-free™ (ThermoFischer Scientific) zgodnie z opisem dołączonym przez producenta. W celu sekwencjonowania RNA, integralność RNA zweryfikowano przy użyciu analizatora Agilent Bioanalyzer 2100. RNA wyekstrahowany z tkanek pacjentów z GBM o wartości RIN co najmniej 7 zostały użyte do przygotowania bibliotek i analizy RNA-seq, a także do analizy qPCR (ang. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) w celach walidacyjnych.

2.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych prowadzono w 1,2 - 1,5 % żelach agarozowych z dodatkiem SYBR™ Safe firmy ThermoFischer Scientific. W skrócie odpowiednią ilość agarozę rozpuszczano w buforze TBE, a następnie podgrzewano do momentu równomiernego rozpuszczenia agarozę. Do przestudzonej mieszaniny dodawano SYBR™ Safe w stężeniu 0,5 µg/ml. Do próbek zawierających DNA/RNA dodawano obciążacz, a rozdział prowadzono przez godzinę w buforze TBE, przy napięciu 5V/cm. Do oznaczania długości fragmentów kwasów nukleinowych używano markerów wielkości 100 i 1000 pz (ThermoFischer Scientific). Produkty rozdziału wizualizowano poprzez fluorescencję system dokumentacji żeli G-BOX CHEMI XR5 firmy Syngene.

2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcję odwrotnej transkrypcji przeprowadzono przy użyciu gotowego zestawu Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) zgodnie z protokołem producenta. Matrycą do reakcji odwrotnej transkrypcji był całkowity RNA izolowany ze wszystkich wymienionych typów hodowli oraz tkanek GBM w ilości 500 ng/próbkę. Skład mieszaniny

reakcyjnej i kolejne etapy reakcji przedstawiono w tabeli numer 12. Produkty odwrotnej transkrypcji - komplementarny DNA (cDNA) – przechowywano w -20°C i wykorzystywanego jako matrycę w reakcji qPCR.

Tabela 12. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

Etap	Składnik	Ilość	Warunki
I	Matryca (RNA)	500 ng	Inkubacja 10 minut w 65°C , schłodzenie na lodzie
	Starter (random hexamer primer) – 600pmol/ μl	1 μl	
	Woda	Do 13 μl	
II	Bufor 5x	4 μl	Inkubacja 10 minut w 25°C , następnie 60 minut w 50°C
	Inhibitory RNaz 40U/ μl	0,5 μl	
	Odwrotna transkryptaza 20U/ μl	0,5 μl	
	Miks deoksynukleotydów 10 mM	2 μl	
Inaktywacja	-	-	Inkubacja 5 minut w 85°C

2.10. Reakcja poliadenylacji oraz micro-RT

Reakcji poliadenylacji poddawany został RNA, w którym oceniano następnie poziom ekspresji miRNA. W tym celu użyto gotowego zestawu miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies) stosując się do protokołu producenta. Mieszaninę reakcyjną składającą się z 4 μl 5x poly A polymerase buffer, 1 μl rATP (10mM), 0,5 μl E. coli poly A polymerase oraz 500 ng RNA dopełniono do 10 μl sterylną wodą, a następnie inkubowano w 37°C przez 30 minut i w 95°C przez 5 minut i przeniesiono na lód. Tak przygotowany RNA stanowił matrycę dla reakcji micro-RT, którą przeprowadzono z użyciem gotowego zestawu odczynników miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Aglient Technologies). W probówce zmieszano 1 μl 10x AffinityScript RT buffer, 0,4 μl dNTP mix (100mM), 0,5 μl RT adapter primer (10 μM), 0,5 μl AffinityScript RT/RNase Block enzyme mixture, 3,6 μl sterylnej wody oraz 2 μl wcześniej przygotowanego poliadenylovanego RNA. Mieszaninę poddano serii następujących po sobie inkubacji: 5 min w 55°C , 15 min w 25°C , 30 min w 42°C , 5 min w 95°C . Na koniec próby przeniesiono na lód i dodano do każdej z nich 130 μl sterylnej wody.

2.11. Trawienie całkowitego RNA rybonukleazą R i łańcuchowa reakcja polimerazy

W celu potwierdzenia kowalencyjnie zamkniętej struktury wybranych circRNA, 2 μg całkowitego RNA zostało strawione przez dodanie 4U rybonukleazy R (Lucigen, RNR07250) i inkubację w temperaturze 37°C przez 10 minut. Następnie rybonukleazę inaktywowano przez inkubację w temperaturze 65°C przez 20 minut. Tak otrzymany strawiony RNA

oczyszczano za pomocą kolumn NucAway Spin (Invitrogen, AM10070) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Oczyszczony i strawiony RNA posłużył jako matryca do odwrotnej transkrypcji, a otrzymany w ten sposób cDNA został użyty do przeprowadzenia reakcji PCR (ang. *Polymerase Chain Reaction*) z wykorzystaniem starterów specyficznych dla wybranych transkryptów liniowych i kolistych. Warunki oraz skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli numer 13 i 14. Deplecję liniowej formy transkryptu oraz obecność circRNA potwierdzono analizując produkty PCR na żelu agarozowym.

Tabela 13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR.

Składnik	Ilość
GoTaq G2 Master Mix, 2x	25 µl
Starter F (10 µM)	5 µl
Starter R (10 µM)	5 µl
Matryca cDNA	50-100 ng
H ₂ O	Do 50 µl

Tabela 14. Warunki reakcji PCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	3 minuty	1
Denaturacja	95°C	30 sekund	35-40
Przyłączanie starterów	60 °C	30 sekund	
Elongacja	72 °C	1 minuta/1000 par zasad	
Końcowa elongacja	72 °C	72 °C	1
Chłodzenie	4 °C	∞	1

2.12. Frakcjonowanie

Komórki GBM w liczbie 5×10^6 przemyto buforem PBS, a następnie zwirowano przy 200 rcf przez 5 minut. Osad komórkowy poddano 5-minutowej lizie przy użyciu buforu składającego się z 10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 0.15 % i 20 U/ml inhibitorów RNaz. Lizat nakładano na wierzch buforu sacharozowego składającego się z 10 mM Tris, pH 7.4, 150 mM NaCl, 24 % sacharozę i 20 U/ml inhibitorów RNaz. Następnie całość wirowano przy 3500 rcf przez 10 minut. Supernatant zawierający frakcję cytoplazmatyczną przenoszono do nowej probówki i wirowano przy 14000 rcf przez minutę w celu oczyszczenia, a osad zawierający frakcję jądrową przepłukiwano zimnym buforem PBS-EDTA i wirowano przez 5 sekund przy 3500 rcf. Frakcja jądrowa została następnie przepłukana przez strzykawkę insulinową z igłą 21G w celu jej rozpuszczenia. Wszystkie wirowania odbywały się w

temperaturze 4°C, a całą procedurę wykonywano na lodzie. Z frakcji cytoplazmatycznej oraz jądrowej izolowano RNA. Czystość oby frakcji potwierdzano z wykorzystaniem odpowiednich markerów cytoplazmatycznych i jądrowych. Tak przygotowany materiał poddawano następnie analizie qPCR.

2.13. Transfekcja za pomocą siRNA

Wybrane eksperymenty przeprowadzone na liniach komórkowych i sferoidach wymagały obniżenia poziomu ekspresji poszczególnych transkryptów za pomocą krótkich interferujących RNA – siRNA (ang. *Short Interfering RNA*). Sekwencje zaprojektowanych siRNA zostały przedstawione w tabeli numer 15. W przypadku obniżania ekspresji transkryptów liniowych użyto gotowych siRNA z firmy Sigma Aldrich (ATXN10 - SASI_Hs01_00149923, FAM188A - SASI_Hs01_0011-0292, EIF4A3 – AM16704).

Tabela 15. Sekwencje siRNA.

Nazwa	Sekwencja siRNA (5'→3')
siRNA kontrolne circATXN10 (scrambled) nić sensowna	AUUAAAUGUCGUUGGGAUCGC [dTdT]
siRNA kontrolne circATXN10 (scrambled) nić antysensowna	GCGAUCCCAACGACAUUUAU [dTdT]
siRNA.1 circATXN10 nić sensowna	AACCAAGACAAGCUUUUCGCU [dTdT]
siRNA.1 circATXN10 nić antysensowna	GAUAACCAAGACAAGCUUUUC [dTdT]
siRNA.2 circATXN10 nić sensowna	AGUAACCAAGACAAGCUUUU [dTdT]
siRNA.2 circATXN10 nić antysensowna	AAAAGCUUGUCUUGGUUAUCU [dTdT]
siRNA.3 circATXN10 nić sensowna	ACAAGCUUUUCGUGUGGCCU [dT][dT]
siRNA.3 circATXN10 nić antysensowna	AGGCCACAGCGAAAAGCUUGU [dT][dT]
siRNA.1 circFAM188A nić sensowna	AGAUACUGUAAGGGUUUGUGU [dTdT]
siRNA.1 circFAM188A nić antysensowna	ACACAAACCCUUACAGUAUCU [dTdT]
siRNA.1 circFAM188A nić sensowna	GAUACUGUAAGGGUUUGUGUU [dTdT]
siRNA.1 circFAM188A nić antysensowna	AACACAAACCCUUACAGUAUC [dTdT]
siRNA.1 circFAM188A nić sensowna	AGAUACUGUAAGGGUUUGUGU [dTdT]
siRNA.1 circFAM188A nić antysensowna	ACACAAACCCUUACAGUAUCU [dTdT]
siRNA kontrolne circFAM188A (scrambled) nić sensowna	UACACUACAUAACAGUAACC [dTdT]
siRNA kontrolne circFAM188A (scrambled) nić antysensowna	GGUUAUCUGUUAUGUAGUGUA [dTdT]

W celu dostarczenia siRNA do komórek, zastosowano transfekcję z wykorzystaniem odczynnika na bazie poliamin - siPORT™ Amine Transfection Agent (ThermoFisher Scientific, AM4502) zgodnie z protokołem producenta. Komórki wysiewano 24 h przed transfekcją na płytki 6-dołkowe lub 96-dołkowe zgodnie z warunkami podanymi w tabelki

numer 8. Jako kontroli transfekcji używano kontrolnego siRNA (scr – scrambled), który podawany był w tym samym stężeniu co właściwe siRNA. Transfekcję przeprowadzano przy konfluencji komórek wynoszącej 80-90 %. Komórki przemywano buforem PBS i dodawano do nich niesuplementowane medium w ilości zredukowanej o objętość mieszaniny transfekcyjnej. Końcowe stężenie siRNA wynosiło 25 nM oraz 50 nM. Pierwszym krokiem przygotowania mieszaniny transfekcyjnej było połączenie siPORT Amine Transfection Agent oraz Opti-MEM I Reduced Serum Medium (ThermoFisher Scientific, 11520386) w jednej probówce oraz odpowiedniej ilości siRNA z Opti-MEM w drugiej probówce. Obie mieszaniny inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej, a następnie łączono i powtórnie inkubowano 10 min. Dokładny skład mieszanin przedstawiono w tabeli numer 16.

Tabela 16. Skład mieszanin transfekcyjnych.

Mieszanina I				
Składnik	Płytki 6-dółkowa		Płytki 96-dółkowa	
Opti-MEM	95 µL		9,7 µL	
siPORT	5 µL		0,3 µL	
Mieszanina II				
Składnik	Płytki 6-dółkowa		Płytki 96-dółkowa	
Opti-MEM	98,75 ul	97,5 ul	9,875 ul	9,75 ul
siRNA (50 µM)	Stężenie końcowe 25 nM	Stężenie końcowe 50 nM	Stężenie końcowe 25 nM	Stężenie końcowe 50 nM
	1,25 µL	2,5 µL	0,125 µL	0,25 µL

Po inkubacji mieszaninę podawano na dołki płytek hodowlanych, a komórki zbierano po 48 godzinach od momentu przeprowadzenia transfekcji w celu izolacji RNA lub białek, a także w celu przeprowadzenia eksperymentów funkcjonalnych.

2.14. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym

Reakcja PCR w czasie rzeczywistym (ang. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) przeprowadzona została w celu analizy ilościowej RNA dla wybranych transkryptów. Jako matrycy używano cDNA uzyskanego w reakcji odwrotnej transkrypcji, a analizę ilościową względem genów referencyjnych (HPRT dla transkryptów kolistych i liniowych oraz r18S dla miRNA) przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej (metoda $\Delta\Delta Ct$).

Każda próbka analizowana była w tryplikacie w termocyklerze CFX Connct (Bio-Rad). Mieszaninę reakcyjną przygotowywano z użyciem odczynników LightCycler® 480

SYBR Green I Master (Roche), a jej skład oraz warunki reakcji przedstawiono w tabeli numer 17 i 18.

Krzywe standardowe dla każdej pary starterów uzyskano poprzez amplifikację serii rozcieńczeń cDNA (x1, x2, x4, x8, x16, x32), a optymalną temperaturę dla przyłączania starterów do matrycy ustalano za pomocą zastosowania gradientu temperaturowego. Jakość uzyskanych produktów PCR sprawdzono poprzez analizę krzywych topnienia oraz za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.

Tabela 17. Skład mieszaniny reakcyjnej reakcji qPCR.

Składnik	Ilość
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Starter Forward (5 uM)	1 µl
Starter Reverse (5 uM)	1 µl
Woda	2 µl
Matryca cDNA	1 µl

Tabela 18. Warunki reakcji qPCR.

Etap	Temperatura	Czas	Liczba powtórzeń
Denaturacja wstępna	95°C	10 minut	1
Denaturacja	95°C	15 sekund	40
Przyłączanie starterów	55-65 °C	30 sekund	
Elongacja	72°C	30 sekund	
Końcowa elongacja	72°C	2 minuty	1
Oznaczanie krzywej topnienia	95°C	1 min	1
	50°C	30 s	
	55-95°C	0,1°C/s	
	95°C	30s	
Chłodzenie	4 °C	∞	1

2.15. Test zabliźniania rany

Komórki poddawano testowi zabliźniania rany w celu oceny potencjału migracyjnego po obniżeniu poziomu ekspresji wybranych transkryptów. Po 48 godzinach po transfekcji pożywkę na płytkach hodowlanych wymieniano na świeżą. Za pomocą końcówki do pipet o pojemności 200 µL wykonywano rysę na środku dołka płytki 6-dołkowej. Co 24 godziny wykonywano zdjęcia dołków, do momentu zarośnięcia rysy w dołku, w którym komórki transfekowane były siRNA kontrolnym. Dane analizowane były za pomocą oprogramowania TScratch.

2.16. Test formowania sfery

Sferoidy pochodzące z komórek GBM po transfekcji siRNA na płytce 96-dołkowej oceniano pod względem ich potencjału inwazyjnego. Po 48 godzinach od transfekcji zmieniano pożywkę na świeżą (niesuplementowaną), a Matrigel® (Corning Cat. No. 356234) rozcieńczano do stężenia końcowego 2,8 mg/mL i podawano na wierzch pożywki. Następnie płytkę inkubowano w 37°C przez 30 minut, aby spolimeryzować Matrigel®. Po inkubacji dodawano 50 µL suplementowanej pożywki na wierzch każdego dołka, a płytkę umieszczano w inkubatorze. Inwazję komórek monitorowano przez 192 godziny, wykonując co 24 godziny zdjęcia pod mikroskopem świetlnym.

2.17. Monitorowanie tempa migracji

Komórki poddano monitorowaniu tempa migracji po obniżeniu poziomu ekspresji wybranych transkryptów za pomocą systemu xCELLigence przy użyciu aparatu RTCA DP (Agilent). Eksperyment przeprowadzono na 16-dołkowych płytkach, w których do dolnej części dodano pożywkę hodowlaną z dodatkiem FBS pełniącą funkcję chemoatraktantu. Do górnej części płytki dodano pożywkę niesuplementowaną i w pierwszym etapie zmierzono wartość oporu elektrycznego tła. Następnie w górnej komorze każdej studzienki wysiano 10 tyś. komórek U251-MG oraz U138-MG transfekowanych wcześniej siRNA. Płytkę CIM umieszczono w aparacie RTCA DP i przez 36 godzin rejestrowano poziom oporu elektrycznego w odstępach 15-minutowych.

2.18. Analiza dystrybucji komórek w cyklu komórkowym

W celu określenia dystrybucji komórek w cyklu komórkowym wykorzystano metodę cytometrii przepływowej z barwieniem komórek jodkiem propidyny za pomocą gotowego zestawu Guava® Cell Cycle Reagent (Luminex, 4500-0220) według protokołu dostarczonego przez producenta. Komórki GBM, 48 h po transfekcji siRNA, zbierano, przemywano dwukrotnie zimnym buforem PBS, a następnie utrwalano przez dodawanie 800 µl zimnego etanolu 70 % przy jednoczesnym wortexowaniu próbek. Następnie próbki inkubowano przez minimum 12 godzin w -20°C. Następnego dnia komórki wirowano przez 5 minut przy 450 rcf w temperaturze 4°C. Supernatant zlewano, a komórki przemywano zimnym buforem PBS i powtórnie wirowano. Po usunięciu supernatantu dodawano 200 µL reagenta zawierającego jodek propidyny i inkubowano 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemni. Ocenę żywotności komórek przy użyciu jodku propidyny przeprowadzono z wykorzystaniem cytometru przepływowego Luminex Guava Muse Cell Analyzer.

2.19. Indukcja przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego za pomocą TGFβ

Komórki wysiane na płytkę 6-dołkową traktowano transformującym czynnikiem wzrostu beta – TGFβ o końcowym stężeniu 5ng/ml, w standardowych warunkach hodowli. Komórki zbierano co 24 godziny, izolowano RNA, które poddawano analizie RT-qPCR z uwzględnieniem potwierdzenia zmiany fenotypu komórek z nabłonkowego na mezenchymalny za pomocą odpowiednich markerów.

2.20. Indukcja hipoksji

Komórki GBM poddawane były warunkom niedoboru tlenu przez 5 dni w inkubatorze z zawartością tlenu wynoszącą 1 %, w celu indukcji hipoksji. Równocześnie jako kontrolę, w standardowych warunkach, hodowano ten sam pasaż komórek. Następnie z obu hodowli izolowano RNA, które poddawano następnie analizie qPCR, z uwzględnieniem potwierdzenia wystąpienia hipoksji za pomocą odpowiednich markerów hipoksyjnych.

2.21. Przygotowanie konstruktów do podwyższenia poziomu ekspresji kolistej formy ATXN10 i FAM188A w liniach komórkowych

W celu przygotowania wektora do podwyższenia poziomu ekspresji poszczególnych circRNA w liniach komórkowych wykorzystano gotowy zestaw In-Fusion® HD Cloning (Takara Bio, 102518) i przeprowadzono reakcję zgodnie z instrukcją producenta.

W pierwszym kroku zlinearyzowano wektor pcDNA3.1(+) CircRNA Mini Vector (Adgene, 60648) za pomocą reakcji Inverse PCR, w której wykorzystano startery zawierające dodatkowe 15 nukleotydów na końcu 5', które były komplementarne do obu końców insertów. W probówce wymieszano 12,25 µL CloneAmp HiFi PCR Premix, 2,5 µL startera F (5 µM), 2,5 µL startera R (5 µM), oraz 0,1 ng wektora, a całość dopełniono do 25 µL sterylną wodą. Reakcję PCR prowadzono według warunków przedstawionych w tabeli numer 14. Linearyzację wektora potwierdzono za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, a całość oczyszczono poprzez inkubację w 37 °C przez godzinę z enzymem DpnI, który strawił kowalencyjnie zamknięte plazmidy. Następnie próbki oczyszczono na kolumnkach za pomocą gotowego zestawu (QIAquick PCR Purification Kit, 28104) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

W celu uzyskania insertów, będących pełną sekwencją wybranych circRNA, w probówce wymieszano 12,25 µl CloneAmp HiFi, 2,5 µL startera F (5 µM), 2,5 µL startera R (5 µM,) 100 ng cDNA z linii komórkowej GBM, a całość dopełniono do 25 µL sterylną

wodą. Reakcję PCR przeprowadzono według warunków przedstawionych w tabeli 14. Długość oraz jakość uzyskanych insertów sprawdzono za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, a całość oczyszczono na kolumnkach za pomocą gotowego zestawu (QIAquick PCR Purification Kit, 28104) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta. Wszystkie startery użyte w eksperymencie przedstawiono w tabeli numer 18.

Następnie stężenie produktów PCR (insertów) oraz zlinearyzowanego wektora ustalono z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop. W celu przeprowadzenia klonowania w próbce wymieszano 2 µl 5X In-Fusion HD Enzyme Premix, 70 ng oczyszczonego insertu, 160 ng zlinearyzowanego wektora, a całość dopełniono do 10 µl sterylną wodą. Całość inkubowano 15 minut w 37°C, 15 minut w 50°C a następnie schłodzono na lodzie. Jako kontroli negatywnej użyto próbki bez dodanego oczyszczonego insertu. Tak przygotowany wektor używany był do transformacji bakterii metodą szoku cieplnego.

Tabela 19. Sekwencja starterów użytych do przygotowanie konstruktów.

Nazwa	Sekwencja startera (5'→3')
Startery do linearyzacji wektora circATXN10.F	GATAACCAAGACAAGGTAAGAAGCAAGGTTTC
Startery do linearyzacji wektora circATXN10.R	GGCCACAGCGAAAAGCTGAAGTATAAAAAAAAAAAG
Startery do linearyzacji wektora circFAM188A.F	CACTAAACACAAACCCTGAAGTATAAAAAAAAAAAG
Startery do linearyzacji wektora circFAM188A.R	TTAAGATACTGTAAGGTAAGAAGCAAGGTTTC
Insert circATXN10.F	CTTTTCGCTGTGGCCTGCAGTTTTTTAG
Insert circATXN10.R	CTTGTCTTGGTTATCTTTATTCTTG
Insert circFAM188A.F	GGTTTGTGTTTAGTGAATCAG
Insert circFAM188A.R	CTTACAGTATCTTAAAGCTTCC

2.22. Transformacja bakterii metodą szoku cieplnego

Do 100 µl zawiesiny bakterii kompetentnych *E. coli* (Promega, JM109) dodano 10 ng wektora z odpowiednim konstruktem, inkubowano przez 30 minut na lodzie, a następnie 90 sekund w 42°C. Próbkę schłodzono, a następnie dodano do 200 µl pożywki LB. Połowę próbki nanoszono na płytki Petriego ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę w stężeniu 50 µg/ml i umieszczono w inkubatorze w temperaturze 37°C na 16 godzin.

2.23. PCR kolonijny

PCR kolonijny przeprowadzono w celu identyfikacji rekombinowanych plazmidów i potwierdzenia prawidłowości przeprowadzonej transformacji bakterii. Końcówki do pipet o pojemności 200 μ l zanurzano w pojedynczych koloniach bakteryjnych, a następnie tak pobrane fragmenty kolonii zawieszano w 50 μ l sterylnej wody, a próbki poddawano denaturacji w 95°C przez 10 minut. Następnie wirowano przez 5 min przy 12 000 rpm, a supernatant wykorzystywano jako matrycę do reakcji PCR. W próbce wymieszano: 5 μ l 2xMyTaq Red Mix (Meridian Bioscience, BIO-25043), 1 μ l startera F (5 μ M), 1 μ l startera R (5 μ M) oraz 4 μ l wcześniej przygotowanej matrycy. Reakcję przeprowadzono według warunków przedstawionych w tabeli numer 14. Identyfikacji produktów PCR dokonywano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.

2.24. Izolacja plazmidów w dużej skali

W celu namnożenia plazmidu z konstruktem, pojedyncze kolonie transformowanych bakterii przenoszono do 10 ml pożywki LB zawierającej antybiotyk selekcyjny (ampicylina – 50 μ g/ml pożywki). Po 16 godzinach inkubacji w temperaturze 37°C z wytrząsaniem przy 250 rpm przenoszono 1 ml hodowli do kolby hodowlanej zawierającej 100 ml pożywki LB z ampicyliną. Hodowlę bakterii prowadzono do momentu osiągnięcia gęstości optycznej $OD_{600}=1,5$. Następnie całość wirowano przez 10 minut w 4°C przy 4000 rpm, a izolację plazmidów wykonano z użyciem gotowego zestawu HiSpeed Plasmid Maxi Kit (Qiagen, 12643) zgodnie z instrukcją producenta. Pomiaru wyizolowanego DNA wykonano z wykorzystaniem spektrofotometru NanoDrop 2000 przy długości fali $\lambda 260$ nm. Jakość wyizolowanego plazmidu oceniano za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym, a próbki przechowywano w -20°C.

2.25. Transfekcja komórek plazmidem

W celu dostarczenia plazmidów z konstruktem do nadekspresji circRNA do komórek, zastosowano transfekcję z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (ThermoFisher Scientific, 11668019) zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta. Komórki wysiewano 24 h przed transfekcją na płytki 6-dołkowe, a w dniu transfekcji zmieniano pożywkę na niesuplementowaną. Komórki transfekowano plazmidem o stężeniu 1 μ g oraz 3 μ g. W jednej próbce wymieszano 6,5 μ l Lipofektaminy z 243,5 μ l Opti-MEM, a w drugiej przygotowywano mieszaninę plazmidu o odpowiednim stężeniu z pożywką Opti-MEM. Po 10 minutach inkubacji w temperaturze pokojowej łączono mieszaninę lipofektaminy z

mieszaniną plazmidu i ponownie inkubowano w temperaturze pokojowej przez 20 minut. Tak przygotowany miks reakcyjny dodawano do hodowli komórkowej (500 μ l/dolek). Jako kontroli używano pustego plazmidu, a komórki hodowano przez 48 godzin, po czym zbierano je w celu izolacji RNA lub białka.

2.26. Sekwencjonowanie DNA metodą Sangera

W celu walidacji circRNA (poprzez identyfikację miejsca BSJ) oraz w celu potwierdzenia prawidłowości przygotowania konstruktów do nadekspresji circRNA, przygotowywano próbki zawierające 4,5 μ l startera (10 μ M), 450 ng DNA plazmidowego/100 ng produktu PCR uzupełnione do 15 μ l sterylną wodą. Sekwencjonowanie przeprowadzało Laboratorium Techniki Biologii Molekularnej na Wydziale Biologii UAM w Poznaniu. Otrzymane wyniki analizowano w programie SnapGene.

2.27. Analiza Western Blot (WB)

W celu identyfikacji białek za pomocą techniki immunoblotingu, zebrane komórki przemywano buforem PBS, a następnie wirowano 3 minuty przy 1500 rpm. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 500 μ l buforu 10mM Tris-HCl pH 7,5 suplementowanego inhibitorami proteaz i poddawano sonikacji na lodzie: 3x10 sekund z 20-sekundowymi przerwami przy amplitudzie 75 %. Następnie próbki wirowano 10 minut przy 10000 rpm w 4°C, przenoszono supernatant do nowej próbki typu eppendorf. Stężenie białka mierzono kolorymetrycznie za pomocą metody BCA.

Na żel poliakrylamidowy nakładano od 5 do 10 μ g białka (w zależności od używanego przeciwciała). Każda próbka była najpierw łączona z buforem obciążającym, a następnie poddawana denaturacji w 95°C przez 10 minut. Do rozdzielania białek używano 10 % i 12 % żeli poliakrylamidowych, których skład przedstawiony został w tabeli numer 20.

Tabela 20. Skład żeli poliakrylamidowych do rozdzielania elektroforetycznego białek.

Nazwa składnika	Procentowość		
	10 %	12 %	Żel zagęszczający
Tris-HCl 1M pH 8,8	3,75 ml	3,75 ml	0,62 ml
Akrylamid/Bis-akrylamid, 37,5:1, 30 %	3,35 ml	4 ml	0,85 ml
H ₂ O	2,85 ml	2,2 ml	3,5 ml
SDS 20 %	50 μ l	50 μ l	25 μ l
APS 10 %	75 μ l	75 μ l	75 μ l
Temed	7,5 μ l	7,5 μ l	7,5 μ l

Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakrylamidowym prowadzono w temperaturze pokojowej przy napięciu 250 V i natężeniu prądu 40 mA w buforze do rozdzielania białek przez ok. 2 godziny. Wielkość białka oznaczano na podstawie rozdzielania markera PageRuler Plus. Po rozdzielaniu białka transferowane były na membranę PVDF w buforze do transferu przez 45-60 min (w zależności od wielkości białka) w temperaturze 4°C przy stałym natężeniu 130 mA. Następnie membranę przepłukiwano 3x5 min. w buforze do płukania i blokowano przez godzinę w 5 % roztworze mleka w TBST w temperaturze pokojowej na wytrząsarce. Następnie membranę inkubowano z odpowiednim przeciwciałem monoklonalnym rozcieńczonym w 5 % roztworze mleka w TBST (rozcieńczenie każdego przeciwciała ustalano eksperymentalnie podczas optymalizacji, a informacje o nich zamieszczono w tabeli numer 4) w temperaturze 4°C przez całą noc na wytrząsarce. W niniejszej pracy użyto następujących przeciwciał: anti-ATXN10 (Sigma HPA049531) w rozcieńczeniu 0,2 µg/ml oraz anti-Ago2 (R.386.2, Invitrogen) w rozcieńczeniu 1:1000. Następnego dnia, po trzykrotnym przemyciu, membranę inkubowano przez godzinę (temperatura pokojowa) z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (w zależności od gatunku, z którego pochodziło przeciwciało pierwszorzędowe używano przeciwciał z firmy Sigma-Aldrich: Anti-Mouse IgG (Peroxidase antibody produced in rabbit A9044) / Anti-Rabbit IgG (Peroxidase antibody produced in goat A6154)). Następnie przemycano membranę 3x5 min. w buforze do płukania i dodawano substrat ECL. Sygnał chemiluminescencji uwidaczniano za pomocą systemu Alliance Q9 (Uvitec Cambridge), a intensywność prążków oceniano densytometrycznie przy wykorzystaniu programu ImageQuant (Molecular Dynamics).

2.28. Immunoprecypitacja AGO2

W celu określenia potencjalnego wiązania się kolistych RNA z miRNA przeprowadzono immunoprecypitację białka AGO2. W tym celu komórki GBM (minimum 1×10^7 komórek) oraz zdysocjowane tkanki przemycane były dwukrotnie zimnym buforem PBS. Do komórek dodawano 300 µl zimnego buforu RIP zawierającego inhibitory RNaz i proteaz. Po 30 minutach inkubacji na lodzie lizat zbierano i wirowano w temperaturze 4°C przy 14,000 rcf przez 10 minut. Supernatant przenoszono do nowych próbek. Z każdego lizatu pobierano 5 µl i oznaczano jako „input”. Następnie 300 µl każdej próbki inkubowano na rotorze w temperaturze 4°C z dodanymi 100 µl kulek magnetycznych opłaszczonych białkiem G, w ramach wstępnego oczyszczania z niespecyficznie związanych białek (Pierce Protein G Magnetic Beads, 88847, Thermo Scientific). Po godzinie inkubacji próbki

umieszczano na separatorze magnetycznym, a lizat przenoszono do nowych próbek. W międzyczasie przygotowano próbki, do których dodano po 100 μ l świeżych kulek magnetycznych i 4 μ g przeciwciała anti-Ago2 (R.386.2, Invitrogen). Całość inkubowano na rotatorze w temperaturze pokojowej przez 45 minut. Jako kontroli negatywnej używano próbki z ekwiwalentną ilością IgG króliczego (02-6102, Invitrogen). Następnie do tak przygotowanych kulek dodawano wcześniej uzyskany, oczyszczony lizat komórkowy i całość inkubowano na rotatorze w temperaturze 4°C przez całą noc. Kolejnego dnia kulki przemywano 4 razy buforem RIP na separatorze magnetycznym, a supernatanty przechowywano jako kontrole do analizy western blot. Próbkę rozdzielono na dwie części, jedną z nich wykorzystywano do analizy western blot, a drugą do izolacji RNA w celu określenia obecności kolistych RNA.

2.29. Eksperyment typu „pulldown”

Celem identyfikacji potencjalnych partnerów molekularnych poszczególnych kolistych RNA przeprowadzono eksperyment typu „pulldown”, który opiera się na zastosowaniu biotynylowanych oligonukleotydów, komplementarnych do sekwencji BSJ, która specyficzna jest dla transkryptów kolistych. Ponadto przeprowadzono również „pulldown” liniowego transkryptu ATXN10, a sekwencje antysensownych nukleotydów (ASO) przedstawiono w tabeli numer 21.

Tabela 21. Sekwencje sond wykorzystanych w eksperymencie „pulldown”.

Nazwa sondy	Sekwencja 5'->3'	Znacznik na 3' końcu
circATXN10.1	GGCCACAGCGAAAAGCTTGTCTTGGTTATC	Biotyna
circATXN10.2	CTGCAGGCCACAGCGAAAAGCTTGTCTTGG	Biotyna
circATXN10.3	AACTGCAGGCCACAGCGAAAAGCTTGTCTT	Biotyna
circATXN10.4	CCACAGCGAAAAGCTTGTCTTGGTTATCTT	Biotyna
circFAM188A.1	CACTAAACACAAACCCTTACAGTATCTTAA	Biotyna
circFAM188A.2	AACACAAACCCTTACAGTATCTTAAAGCTT	Biotyna
circFAM188A.3	TGATTCATAACACAAACCCTTACAGTAT	Biotyna
circFAM188A.4	CACAAACCCTTACAGTATCTTAAAGCTTCC	Biotyna
linATXN10.1 Ex2-3	ATCGTATCCAAGTTCCTGATTGAATTCTGG	Biotyna
linATXN10.2 Ex2-3	ATCCAAGTTCCTGATTGAATTCTGGTTCAC	Biotyna
linATXN10.3 Ex2-3	CACCAATCGTATCCAAGTTCCTGATTGAAT	Biotyna
linATXN10.4 Ex2-3	CGTATCCAAGTTCCTGATTGAATTCTGGTT	Biotyna
linATXN10.5 Ex10-11	TGGGTCAGAAAGGGGTTACTGTCACTGATG	Biotyna
linATXN10.6 Ex10-11	TATCACCCACTGGGTCAGAAAGGGGTTACT	Biotyna
linATXN10.7 Ex10-11	CCCACTGGGTCAGAAAGGGGTTACTGTCAC	Biotyna
linATXN10.8 Ex10-11	CACTGGGTCAGAAAGGGGTTACTGTCACTG	Biotyna

LacZ.1	AATGTGAGCGAGTAACAACC	Biotyna
LacZ.2	ATTAAGTTGGGTAACGCCAG	Biotyna
LacZ.3	AATAATTCGCGTCTGGCCTT	Biotyna
LacZ.4	AATTCAGACGGCAAACGCT	Biotyna
LacZ.5	ATCTTCCAGATAACTGCCGT	Biotyna

W pierwszym kroku komórki przemywano dwukrotnie zimnym buforem PBS, a następnie dodawano 500 µl buforu do lizy suplementowanego inhibitorami proteaz i RNaz. Zebrane komórki przenoszono do próbki typu Eppendorf o pojemności 2 ml i całość przynajmniej 8 razy przepłukiwano przez strzykawkę insulinową z igłą 27G, a następnie inkubowano na rotatorze w temperaturze 4°C przez 30 minut. Po inkubacji próbki wirowano 15 minut przy 15000 rcf w temperaturze 4°C. Supernatant przenoszono do nowej próbki o pojemności 2 ml, a stężenie lizatu ustalano za pomocą metody BCA. Do każdej reakcji używano minimum 1 mg lizatu, a w osobnej próbce umieszczono 10 % lizatu oznaczonego jako „input”. Jako kontroli negatywnej używano mieszaniny sond komplementarnych do bakteryjnego transkryptu lacZ. Do przygotowanych lizatów dodawano 100 pm mieszaniny sond specyficznych dla poszczególnych transkryptów zawieszonych w 50 µl buforu do hybrydyzacji, która była wcześniej zdenaturowana w 95°C przez 5 minut. Tak przygotowane próbki inkubowane były na rotatorze przez 4 godziny w temperaturze 4°C. Pod koniec inkubacji przygotowano kulki magnetyczne opłaszczone straptawidyną (Streptavidin MagneSphere, Promega, Z548C). Na jedną reakcję przygotowano 100 µl kulek, które zostały wcześniej przemyte dwukrotnie buforem do hybrydyzacji. Całość inkubowano na rotatorze przez godzinę w temperaturze 4°C po czym przemywano 4 razy buforem do hybrydyzacji z użyciem separatora magnetycznego. Na końcu każdą z próbek rozdzielano na dwie części – do ¼ próbki dodawano 500 µl odczynnika TRizol i izolowano RNA, a ¾ próbki wykorzystywano do przeprowadzenia spektrometrii mas.

2.30. Przygotowanie próbek do spektrometrii mas

Próbki uzyskane podczas eksperymentu typu „pulldown” przekazywano do analizy spektroskopii mas w celu identyfikacji białek oddziałujących z wybranymi transkryptami. Analiza ta została wykonana przez Międzynarodowy Instytut Mechanizmów i Maszyn Molekularnych Polskiej Akademii Nauk (IMol) w Warszawie. Przed wysłaniem próbek wykonywano ich oczyszczanie oraz trawienie białek w celu ich elucji. Na początku próbki przemywano 3 razy buforem 100 mM Tris-HCl pH 7.5 z użyciem separatora magnetycznego. Następnie do każdej próbki dodawano 100 µl buforu HEPES pH 8.0 oraz 1 µg trypsyny

(Promega, V5111) i inkubowano przez godzinę w temperaturze 37°C i wytrząsaniu 1100 rpm. Próbki umieszczano na separatorze magnetycznych i przenoszono supernatant do nowych probówek. Do każdej z nich dodawano TCEP (do końcowego stężenia 5 mM) oraz chloroacetamid (do końcowego stężenia 10 mM), całość inkubowano przez całą noc w temperaturze 37 °C i wytrząsaniu 600 rpm. Na końcu do każdej z próbek dodawano kwas trifluorooctowy (do końcowego stężenia 1 %). Tak przygotowane próbki peptydów przechowywano w -80°C do momentu ich wysłania.

2.31. Spektrometria mas

Weześniej przygotowane peptydy znakowano przy użyciu protokołu znakowania TMT na kolumnie [250]. Aby usunąć produkty uboczne po znakowaniu, mieszaninę peptydów znakowanych TMT odsalano przy użyciu protokołu peptydu opartego na obracalnym C18-StageTip o wysokim pH [251]. Peptydy przemyto 0,1 % TEA / 5 % ACN, eluowano 0,1 % TEA / 50 % ACN i wysuszono w aparacie SpeedVac.

Przed pomiarem LC-MS (ang. *Liquid chromatography-mass spectrometry*) frakcje peptydowe zawieszono w 0,1 % TFA i 2 % acetonitrylu. Rozdział chromatograficzny przeprowadzono na kolumnie Easy-Spray Acclaim PepMap o długości 50 cm i średnicy wewnętrznej 75 µm w temperaturze 55°C, stosując 90-minutowe gradienty acetonitrylu w 0,1 % wodnym roztworze kwasu mrówkowego przy natężeniu przepływu 300 nl/min. System nano-LC UltiMate 3000 połączono ze spektrometrem masowym Q Exactive HF-X za pośrednictwem źródła łatwo rozpylającego. Q Exactive HF-X działał w trybie TMT ze skanami badawczymi uzyskanymi w rozdzielczości 60 000 przy m/z 200.

2.32. Sekwencjonowanie RNA próbek po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10

W celu określenia wpływu obniżenia poziomu ekspresji transkryptu kolistego i liniowego ATXN10 na ogólny profil ekspresji genów w komórkach GBM, wykonano sekwencjonowanie RNA. Sekwencjonowanie przeprowadzone zostało w Pracowni Genomiki w Instytucie Chemii Bioorganicznej w Poznaniu. Po obniżeniu ekspresji transkryptów w liniach U251-MG, U138-MG oraz U87-MG za pomocą siRNA w stężeniu 50 ng (3 powtórzenia biologiczne z każdej linii), z próbek wyizolowano RNA, a stężenie oraz RIN ustalono za pomocą aparatu BioAnalyzer 2100. W przypadku bibliotek cDNA wykorzystano podejście z rybodeplecją, a sekwencjonowanie wykonano z użyciem platformy NextSeq 550 firmy Illumina w technologii krótkich odczytów sparowanych (ang. *Paired-end reads*) o

długości 150 nukleotydów. Odczyty przyrównane zostały do genomu ludzkiego T2T-CHM13 uzyskanego z bazy danych UCSC. Do identyfikacji kolistych i liniowych RNA użyto narzędzia CirComPara2, które bazuje na czterech różnych metodach takich jak DCC, CE2, FC, CIRI2, a różnicowa analiza ekspresji została wykonana za pomocą narzędzia DEseq2 [252,253].

2.33. Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych z pożywki hodowlanej

W celu określenia obecności miRNA i circRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych ulegających sekrecji do pożywki hodowlanej z komórek GBM zastosowano gotowy zestaw do izolacji exoEasy Maxi Kit (Qiagen, 76064). Ponadto porównano poziomy ekspresji circRNA i miRNA w pęcherzykach ulegających sekrecji z komórek GBM hodowanych w hipoksji oraz w standardowych warunkach. W skrócie 16 ml pożywki filtrowano przez filtry o wielkości 0.8 μm (Sartorius, 16592), a następnie dodawano 1 objętość buforu XBP do jednej objętości przefiltrowanej pożywki. Całość nakładano na kolumnienki i wirowano przez 1 minutę przy 500 rcf. Przesącz wylewano, a na kolumnienki nakładano 10 ml buforu XWP i wirowano przez 5 minut przy 5000 rpm. Ponownie wylewano przesącz, a na kolumnienkę dodawano 400 μl buforu do elucji i inkubowano 2 minuty, po czym wirowano 5 minut przy 5000 rpm. Eluat dzielono na dwie części - do jednej z nich dodawano 500 μl odczynnika Trizol i izolowano RNA, a z drugiej części izolowano białka. Poprawność przeprowadzonej izolacji pęcherzyków zewnątrzkomórkowych potwierdzano przez analizę western blot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko markerowi EV jakim jest CD63.

2.34. Analiza statystyczna

Do analizy statystycznej wyników użyto programu GraphPad Prism 8. Wszystkie eksperymenty wykonano w 3 powtórzeniach biologicznych, a wyniki przedstawiono jako wartości średnie z odchyleniem standardowym (SD). Różnice w wartościach średnich między próbką badaną, a kontrolną oceniono za pomocą analizy wariancji ANOVA rozszerzonej testami Tukeya lub Bonferroniego. Wyniki istotne statycznie przedstawiono następująco: * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ i ns dla braku istotności statystycznej ($p > 0,05$).

3. Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej było szczegółowe zbadanie profilu ekspresji kolistych RNA i transkryptów RBP w GBM oraz próba określenia ich roli w rozwoju oraz progresji tego nowotworu. Ważnym elementem badań była także identyfikacja oddziaływań między circRNA, RBP i miRNA. W ramach założonego celu głównego zrealizowano następujące cele szczegółowe:

1. Określenie profilu ekspresji kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym – identyfikacja cząsteczek o potencjale diagnostycznym, prognostycznym i terapeutycznym. Za pomocą sekwencjonowania RNA określony został całkowity profil ekspresji circRNA w tkankach pochodzących od pacjentów chorych na GBM, a także w próbkach zdrowego mózgu. Walidacja eksperymentalna otrzymanych wyników potwierdziła ekspresję wybranych circRNA oraz umożliwiła selekcję kandydatów do dalszych badań funkcjonalnych.

2. Poszukiwanie funkcji wybranych kolistych RNA w glejaku wielopostaciowym. Na podstawie danych uzyskanych z sekwencjonowania wyselekcjonowano circRNA o znacząco obniżonym poziomie ekspresji w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu - circATXN10 i circFAM188A. W celu określenia ich roli w rozwoju i progresji GBM zastosowano podejście typu „utrata funkcji” oraz „nabycie funkcji” z wykorzystaniem odpowiednio siRNA oraz wektora ekspresyjnego. W wyniku przeprowadzonych badań określono funkcję wybranych circRNA, a także schemat ich oddziaływania z transkryptem rodzicielskim, RBP oraz miRNA.

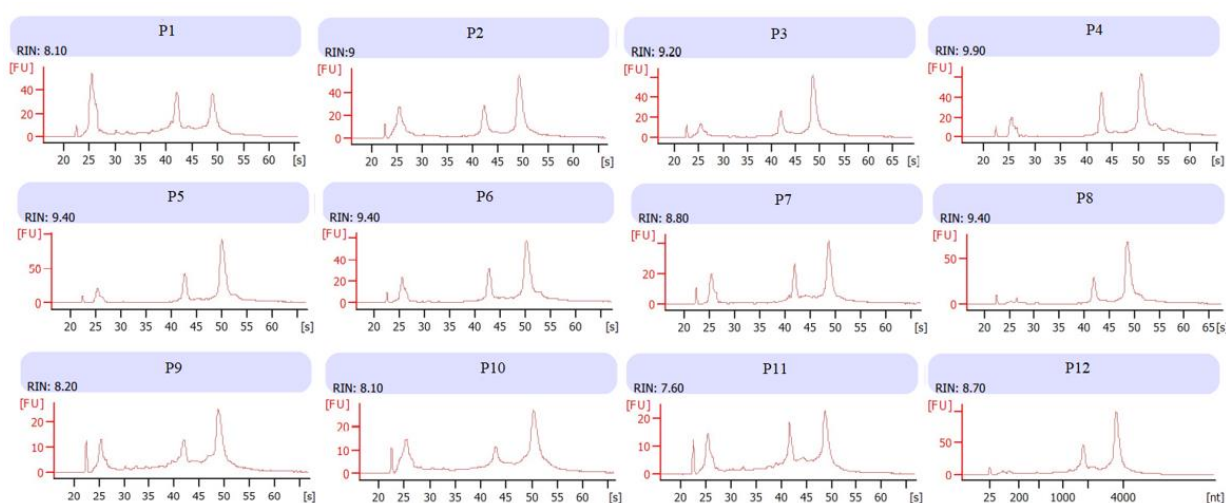
3. Badanie oddziaływania między białkami wiążącymi RNA a kolistymi RNA. Przeprowadzone sekwencjonowania RNA pozwoliło określić profil ekspresji transkryptów białek wiążących RNA w tkankach GBM. Ustalono także korelację między poziomami ekspresji circRNA i transkryptów RBP w GBM, a w przypadku badanych circATXN10 i circFAM188A zidentyfikowano specyficzne białka mogące wpływać na ich biogenezę. W oparciu o uzyskane wyniki zaproponowano dodatkowo nową klasyfikację molekularną guzów opartą o wzór ekspresji transkryptów RBP.

4. Wyniki

4.1. Sekwencjonowanie RNA

4.1.1. Określenie profilu ekspresji kolistych RNA w GBM

W celu określenia profilu ekspresji kolistych RNA przeprowadzono sekwencjonowanie RNA, w którym wykorzystano materiał wyizolowany z guzów pierwotnych (n=23) i wtórnych (n=3) oraz próbek zdrowego mózgu, które posłużyły jako kontrola (n=41). Przed sekwencjonowaniem jakość oraz stężenie RNA zostały zmierzone za pomocą instrumentu BioAnalyzer, a do dalszych analiz przekazane zostały jedynie próbki posiadające wartość RIN (ang. *RNA integrity number*) większą niż 7,5.

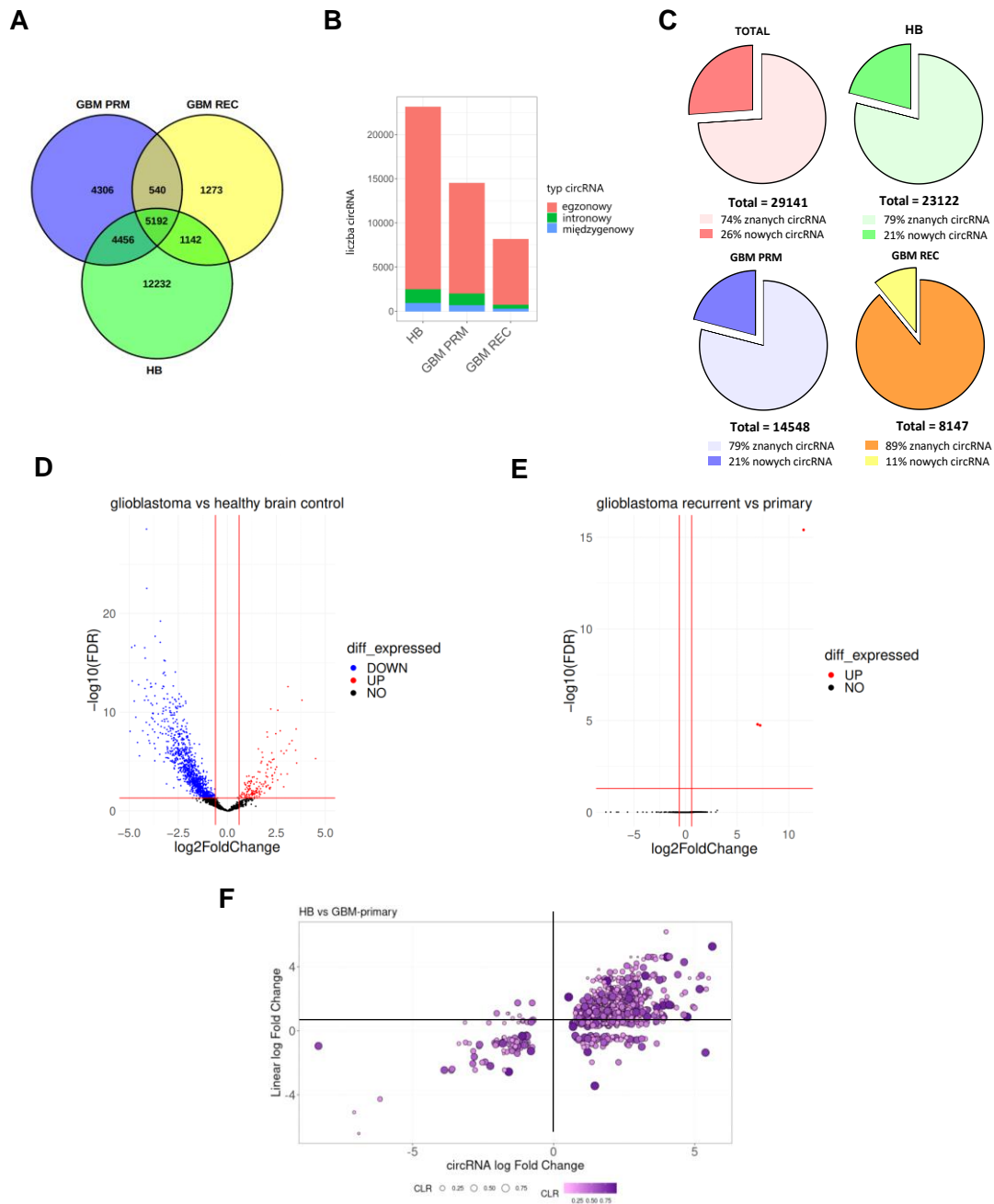


Rycina 4. Integralność RNA z próbek poddanych sekwencjonowaniu. Przykładowe elektroforegramy ilustrujące jakość wyizolowanego RNA oraz wartości RIN poszczególnych próbek.

Wyniki przeprowadzonego sekwencjonowania umożliwiły identyfikację 29141 circRNA we wszystkich próbkach. Spośród nich 10790 ulegało ekspresji zarówno w guzach pierwotnych, wtórnych, jak i w zdrowym mózgu. Ponadto, 4306 circRNA było unikalnych dla próbek guzów pierwotnych, 1273 dla próbek guzów wtórnych, a 12232 dla próbek zdrowego mózgu (Ryc. 5 A). Analiza pochodzenia genomowego zidentyfikowanych circRNA wskazała, iż zdecydowana większość z nich należy do typu egzonowego, a circRNA intronowe i międzygenowe stanowią zdecydowaną mniejszość (Ryc. 5 B). Ponadto zaobserwowano, iż 26 % ze wszystkich zidentyfikowanych circRNA nie było dotąd opisanych w żadnej znanej bazie danych, w tym 21 % circRNA w zdrowym mózgu, 21 % w guzach pierwotnych i 11 % w guzach wtórnych (Ryc. 5 C).

Przeprowadzona analiza różnicowej ekspresji kolistych RNA (pierwotne guzy GBM vs zdrowy mózg) wykazała, iż 1211 circRNA posiada zmieniony poziom ekspresji w guzach

GBM o wartościach zmian \log_2 między 8,9 a -5,6 ($p < 0,05$). Większość z nich - 1056 circRNA (87 %) wykazywała obniżony poziom ekspresji, a 155 circRNA (13 %) podwyższony (Ryc. 5 D). Ponadto, w celu identyfikacji circRNA potencjalnie zaangażowanych w progresję GBM, przeprowadzono analizę różnicowej ekspresji pomiędzy tkankami guzów pierwotnych (ang. *primary*) oraz wtórnych (ang. *recurrent*). Umożliwiła ona identyfikację trzech circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji – circEGFR oraz dwóch wcześniej nieznanymi circRNA – circHLA-B, który powstaje z transkryptu mRNA ludzkiego antygeny leukocytarnego oraz circInter6p22 pochodzący z międzygenowego regionu na chromosomie 6p22.1, który nie posiada swojego liniowego odpowiednika (Ryc. 5 E). Aby określić dokładną relację między circRNA o zmienionym profilu ekspresji, a ich formami liniowymi, wykonano analizę stosunku względnego poziomu ekspresji obu transkryptów. Obrazuje ona wartość CLR (ang. *Circular-to linear ratio*), która obliczana jest na podstawie wzoru $[\text{circ} / (\text{circ} + \text{lin})]$. Wartość $\text{CLR} > 0,5$ oznacza, iż liczba cząsteczek circRNA jest większa niż liczba cząsteczek rodzicielskiego mRNA, natomiast wartość $\text{CLR} < 0,5$ wskazuje na sytuację odwrotną. Analiza ta uwzględnia równocześnie poziom ekspresji obu cząsteczek w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu. Co ciekawe, otrzymane wyniki wskazały, iż w wielu przypadkach liczba circRNA była większa niż liczba ich rodzicielskich odpowiedników liniowych ($\text{CLR} > 0,5$). Zaobserwowano również, że najczęściej nadekspresji ulegała zarówno kolistą jak i liniową cząsteczką, co wskazuje na pozytywną korelację między nimi. Najrzadziej natomiast występowała sytuacja, w której cząsteczka liniowa posiadała zwiększony poziom ekspresji, a circRNA – obniżony, co mogłoby wskazywać na możliwość preferencyjnej ekspresji mRNA wpływających na rozwój GBM kosztem powstawania formy kolistej (Ryc. 5 F).

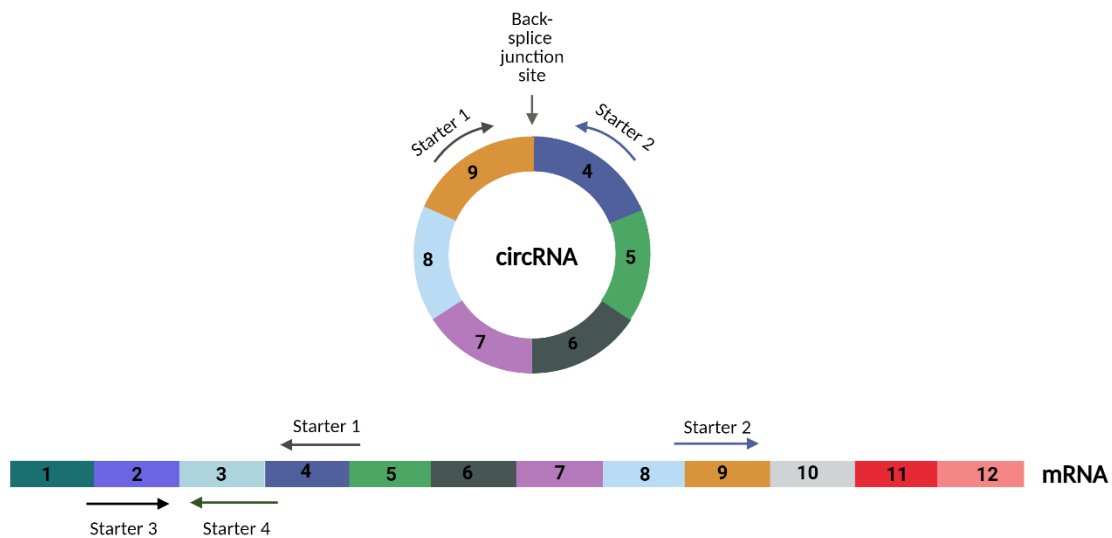


Rycina 5. Profil ekspresji circRNA w pierwotnych i wtórnych guzach GBM. **A.** Diagram Venna przedstawiający zależność między zidentyfikowanymi circRNA w próbkach zdrowego mózgu (HB), guzach pierwotnych (GBM PRM) oraz guzach wtórnych (GBM REC). **B.** Wykres słupkowy przedstawiający pochodzenie genomowe zidentyfikowanych circRNA. **C.** Rozkład znanych (ang. *annotated*) oraz nowych (ang. *novel*) zidentyfikowanych circRNA. **D.** Wykres typu volcano plot ilustrujący liczbę circRNA o zmienionym profilu ekspresji w guzach pierwotnych GBM w porównaniu do próbek kontrolnych zdrowego mózgu (HB). **E.** Wykres typu volcano plot ilustrujący liczbę circRNA o zmienionym profilu ekspresji w guzach wtórnych GBM w porównaniu do guzów pierwotnych GBM. Niebieskie punkty wskazują na circRNA o obniżonym poziomie ekspresji, a czerwone – circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji. **F.** Wykres przedstawiający proporcję poziomów ekspresji kolistych i liniowych RNA w GBM w porównaniu do kontroli. Na osi X zaznaczono $\log_2\text{FC}$ circRNA, a na osi Y wartości $\log_2\text{FC}$ odpowiadających im mRNA. CLR oznacza stosunek względnego poziomu ekspresji circRNA do linRNA.

4.1.2. Walidacja wyników wybranych kandydatów kolistych RNA o obniżonym poziomie ekspresji

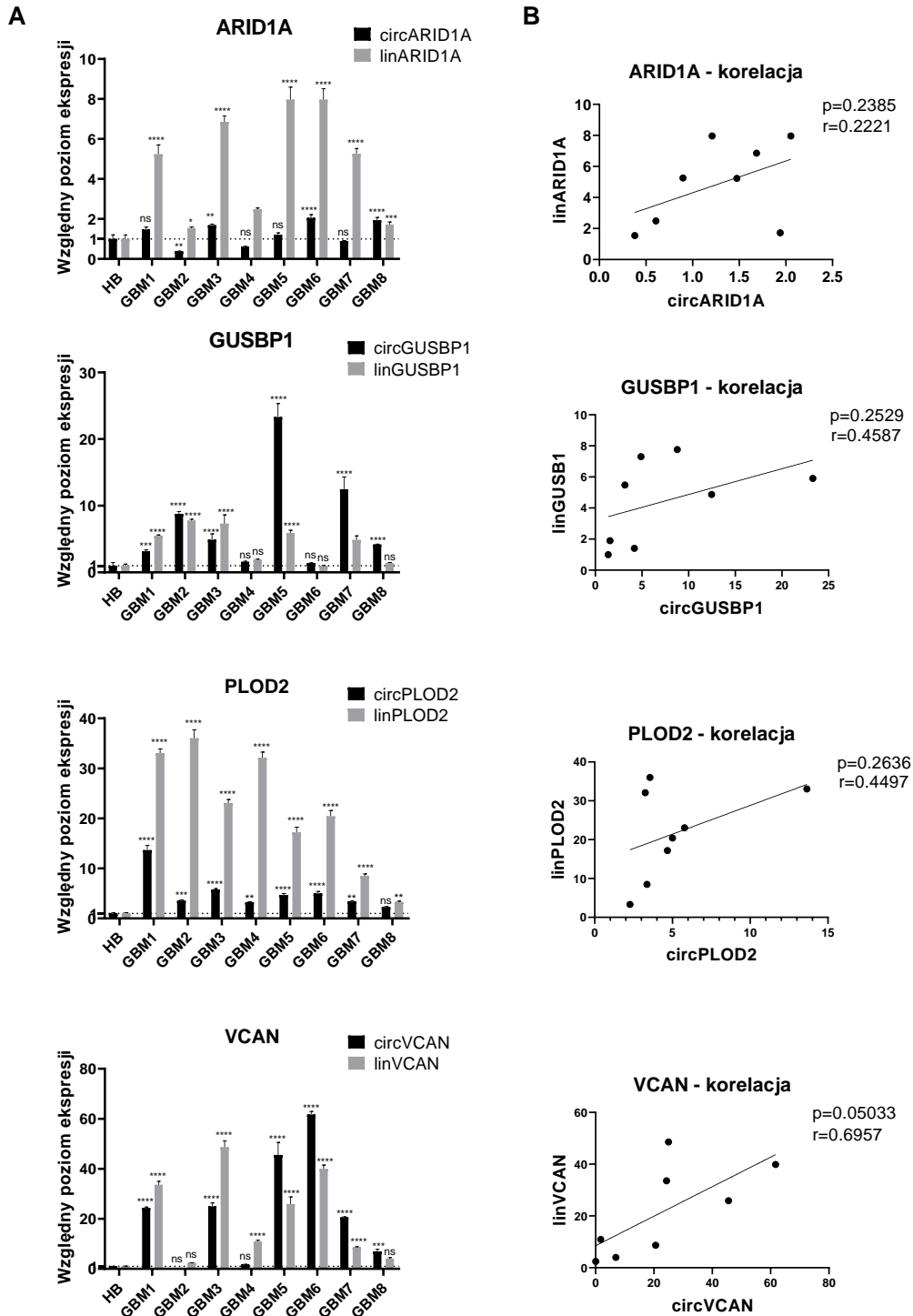
Przeprowadzone sekwencjonowanie RNA umożliwiło identyfikację circRNA o zmienionym poziomie ekspresji w guzach GBM. W celu walidacji otrzymanych wyników wybrano losowe circRNA spośród cząsteczek o najbardziej obniżonym i podwyższonym poziomie ekspresji i potwierdzono ich profil ekspresji za pomocą metody qPCR. Do walidacji użyto cDNA uzyskanego z guzów GBM oraz kontroli, jakim był cDNA ze zdrowego mózgu.

W celu specyficznej amplifikacji transkryptu kolistego i liniowego zaprojektowano unikalne startery. W przypadku kolistego transkryptu amplifikowały one sekwencję obejmującą BSJ, a więc miejsce łączenia końca 5' z końcem 3' (tzw. startery dywergentne). Startery służące do identyfikacji liniowej formy obejmowały natomiast połączenie egzon-egzon, które nie wchodziło w skład circRNA (tzw. startery konwergentne), co umożliwiło specyficzną detekcję każdego z transkryptów (Ryc. 6). Oprócz identyfikacji poziomu ekspresji kolistych i liniowych transkryptów w guzach GBM, określono także poziom korelacji pomiędzy nimi, aby ustalić czy powstawanie obu form może być od siebie zależne.



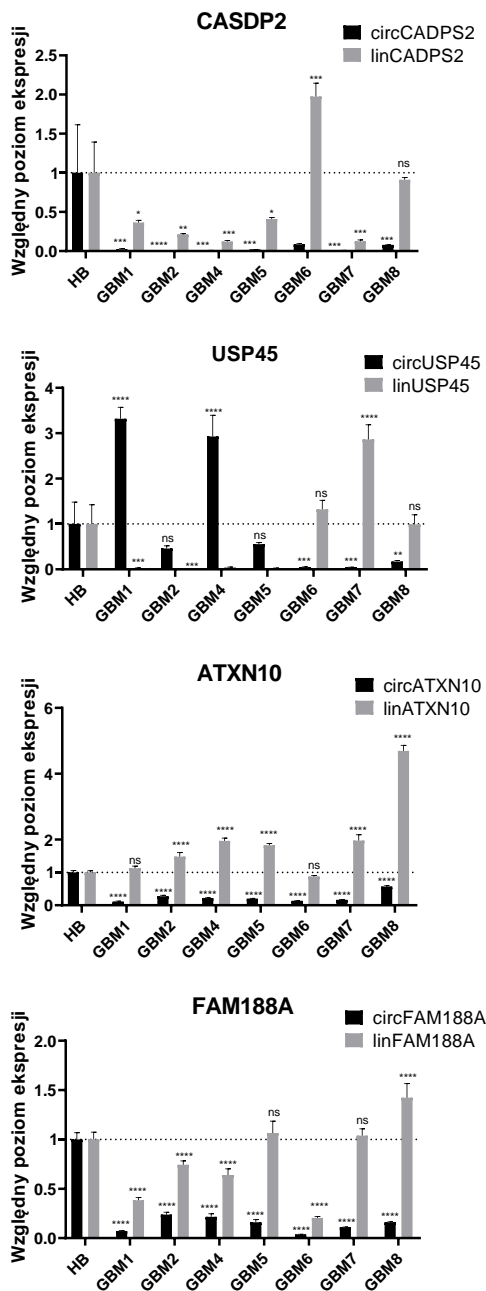
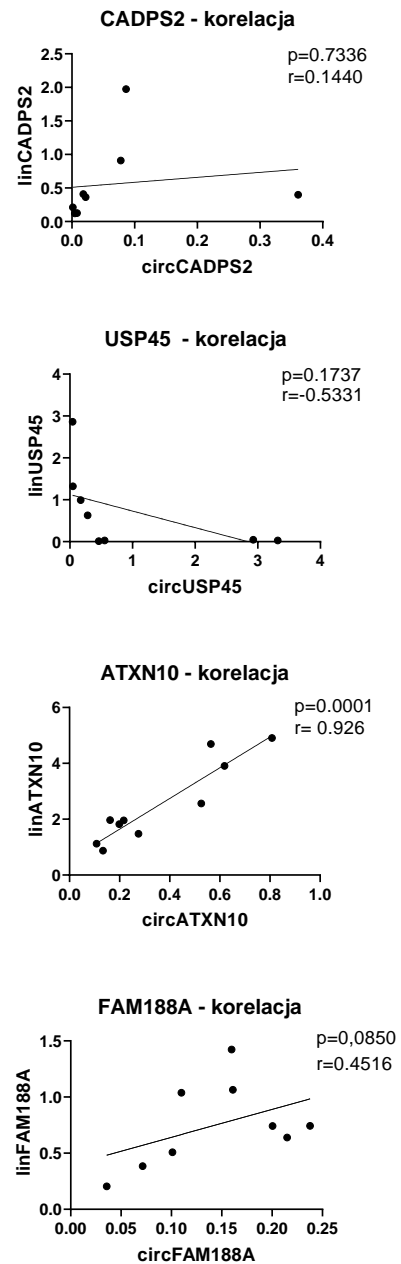
Rycina 6. Schemat projektowania starterów służących do identyfikacji kolistego i liniowego transkryptu. Para starterów 1 i 2 służy do amplifikacji sekwencji obejmującej BSJ w przypadku circRNA, a para starterów 3 i 4 do amplifikacji sekwencji mRNA.

W przypadku badanych circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji, walidacji poddano circARID1A, circGUSBP1, circPLOC2 oraz circVCAN wraz z ich liniowymi odpowiednikami. Szczególnie wysoki poziom ekspresji, bo ponad 60-krotnie większy w guzach GBM, odnotowano w przypadku circVCAN. W tej grupie circRNA zaobserwowano, iż ich liniowe odpowiedniki również charakteryzują się podwyższonym poziomem ekspresji w GBM w porównaniu do kontroli, jaką był zdrowy mózg (Ryc. 7 A). Nie zaobserwowano jednak istotnej statystycznie korelacji pomiędzy poziomami ekspresji circRNA i linRNA, z wyjątkiem transkryptów VCAN, które wykazywały pozytywną korelację (Ryc. 7 B).



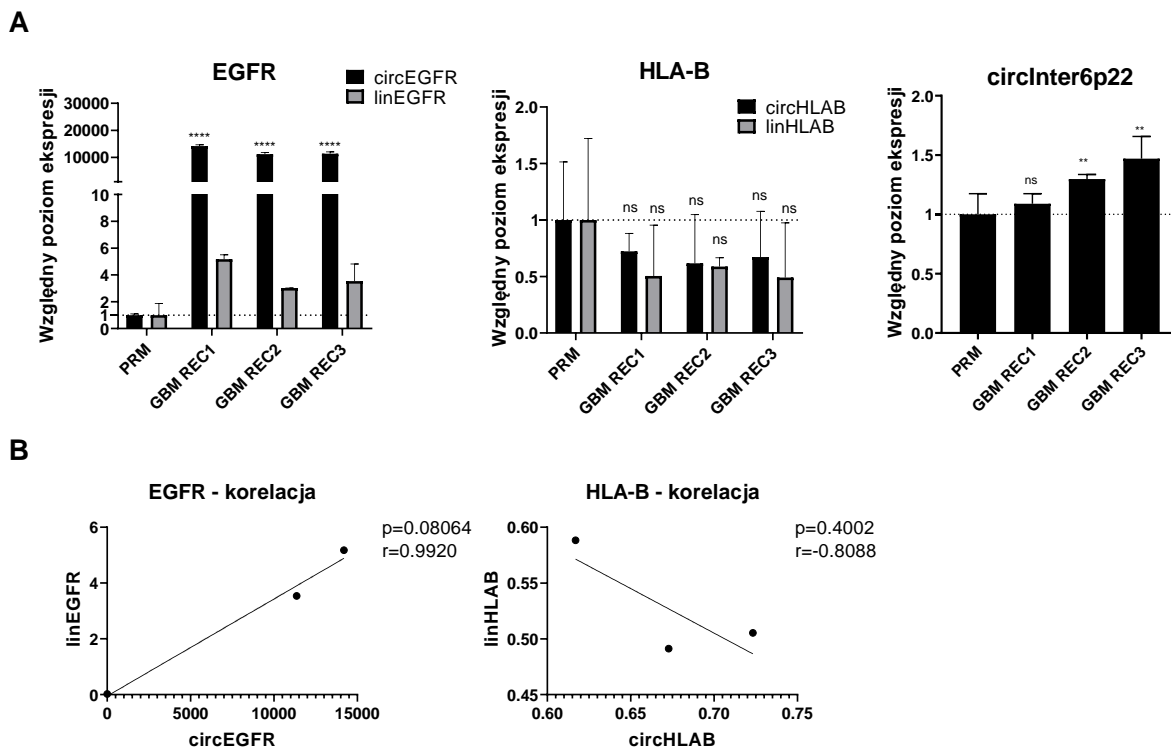
Rycina 7. Walidacja wybranych circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji w guzach pierwotnych GBM za pomocą techniki qPCR. A. Określenie poziomu ekspresji wybranych circRNA oraz mRNA w guzach GBM (GBM 1-8) w porównaniu do kontroli - próbek zdrowego mózgu (HB). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$. **B.** Określenie współczynnika korelacji Pearsona między wybranymi transkryptami kolistymi i liniowymi.

W kontekście kandydatów circRNA o obniżonym poziomie ekspresji walidacji poddano circCADSP2, circUSP45, circATXN10 oraz circFAM188A. Szczególnie niski poziom ekspresji odnotowano w przypadku circCADSP2, którego względny poziom ekspresji był nawet 20-krotnie mniejszy w guzach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu. Również w tej grupie circRNA zaobserwowano, iż obniżeniu poziomu ekspresji formy kolistej towarzyszy obniżenie poziomu ekspresji formy liniowej. Wyjątkiem był circATXN10, w przypadku którego zaobserwowano, iż forma rodzicielska cechuje się podwyższonym poziomem ekspresji w guzach GBM w porównaniu do kontroli jaką był zdrowy mózg (Ryc. 8 A). Ponadto zaobserwowano wysoki poziom korelacji pomiędzy obiema formami tego transkryptu (Ryc. 8 B).

A**B**

Rycina 8. Walidacja wybranych circRNA o obniżonym poziomie ekspresji w guzach pierwotnych GBM za pomocą techniki qPCR. A. Określenie poziomu ekspresji wybranych circRNA oraz mRNA w guzach GBM (GBM 1-8) w porównaniu do kontroli - próbek zdrowego mózgu (HB). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p<0,05$; ** dla $p<0,01$; *** dla $p<0,001$; **** dla $p<0,0001$. **B.** Określenie współczynnika korelacji Pearsona między wybranymi transkryptami kolistymi i liniowymi.

W przypadku kolistych RNA, które charakteryzowały się zwiększonym poziomem ekspresji w guzach wtórnych w porównaniu do guzów pierwotnych potwierdzono podniesiony poziom ekspresji circInter6p22 oraz circEGFR, natomiast nie odnotowano istotnych statystycznie zmian w circHLA-B. Co ciekawe circEGFR wykazywał wyjątkowo wysoki poziom ekspresji - w guzach wtórnych był zwiększony nawet o 15000 razy (Ryc. 9). Żaden z badanych circRNA nie wykazywał jednak istotnej korelacji z poziomem ekspresji swojego liniowego odpowiednika.



Rycina 9. Walidacja wybranych circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji w guzach wtórnych GBM za pomocą techniki qPCR. A. Określenie poziomu ekspresji wybranych circRNA oraz mRNA w guzach GBM (GBM 1-3) w porównaniu do kontroli - próbek guzów pierwotnych (PRM). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p<0,05$; ** dla $p<0,01$; *** dla $p<0,001$; **** dla $p<0,0001$. **B.** Określenie współczynnika korelacji Pearsona między wybranymi transkryptami kolistymi i liniowymi.

Przeprowadzona walidacja potwierdziła wyniki uzyskane na podstawie sekwencjonowania RNA. Wyjątkiem był circHLA-B, który wykazał podwyższony poziom ekspresji w analizie RNA-seq, a wyniki walidacji za pomocą techniki qPCR wskazały, iż zmiana jego poziomu ekspresji nie była istotna statystycznie. Ponadto w przypadku

circUSP45 nie potwierdzono jego obniżonego poziomu ekspresji w guzach GBM. Poniższa tabela podsumowuje otrzymane wyniki.

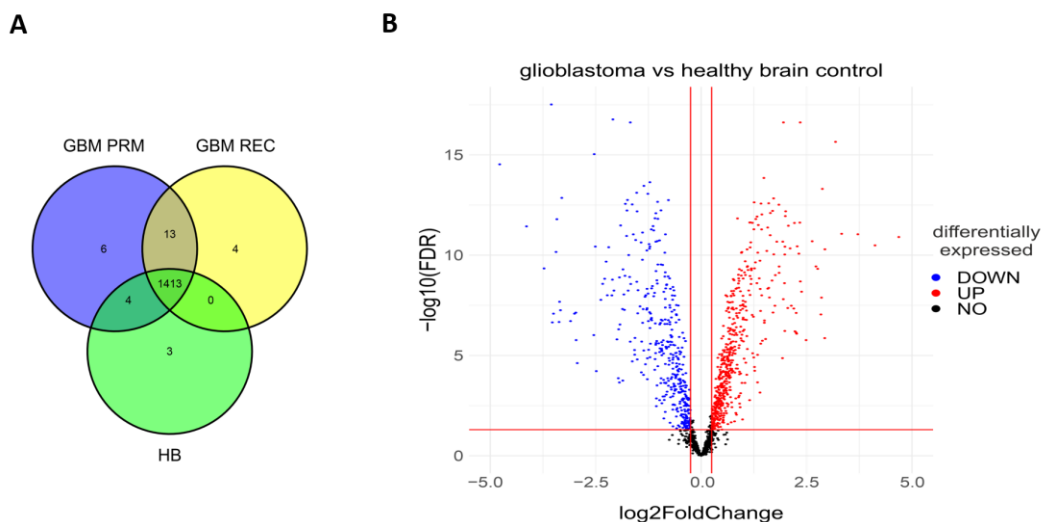
Tabela 22. Porównanie wartości zmian poziomu ekspresji (log2) wyników uzyskanych na podstawie sekwencjonowania RNA i qPCR.

Nazwa	Log2FC qPCR	Log2FC RNA-seq
circARID1A	0,36	2,87
circGUSBP1	2,9	3,96
circPLOD2	2,38	2,82
circVCAN	4,54	3,4
circCADSP2	-3,79	-3,8
circUSP45	-0,03	-4,61
circATXN10	-2,12	-2,48
FAM188A	-2,83	-2,17
circEGFR	12,84	11,4
circHLA-B	-0,4	6,85
circInter6p22	0,31	7,19

4.1.3. Analiza profilu ekspresji transkryptów białek wiążących RNA w glejaku wielopostaciowym

Biorąc pod uwagę potencjalne wiązanie się circRNA i białek, a z drugiej strony możliwy udział RBP w biogenezie circRNA, przeprowadzono analizę profilu ekspresji transkryptów RBP w guzach GBM i ich możliwych interakcji z circRNA.

W pierwszym kroku, na podstawie wyników sekwencjonowania RNA, zidentyfikowano transkrypty RBP ulegające ekspresji w badanych próbkach. W zdrowym mózgu ekspresji ulegało 1420 z nich, w próbkach pierwotnych guzów GBM 1436, a w próbkach guzów wtórnych 1430 (Ryc. 10 A). Analiza różnicowej ekspresji genów wskazała, iż ponad połowa z 1542 dotychczas zidentyfikowanych ludzkich RBP posiadała zmieniony poziom ekspresji w GBM w porównaniu do kontroli zdrowego mózgu – spośród nich 469 charakteryzowało się zwiększonym poziomem ekspresji, a 348 obniżonym (Ryc. 10 B) [245].



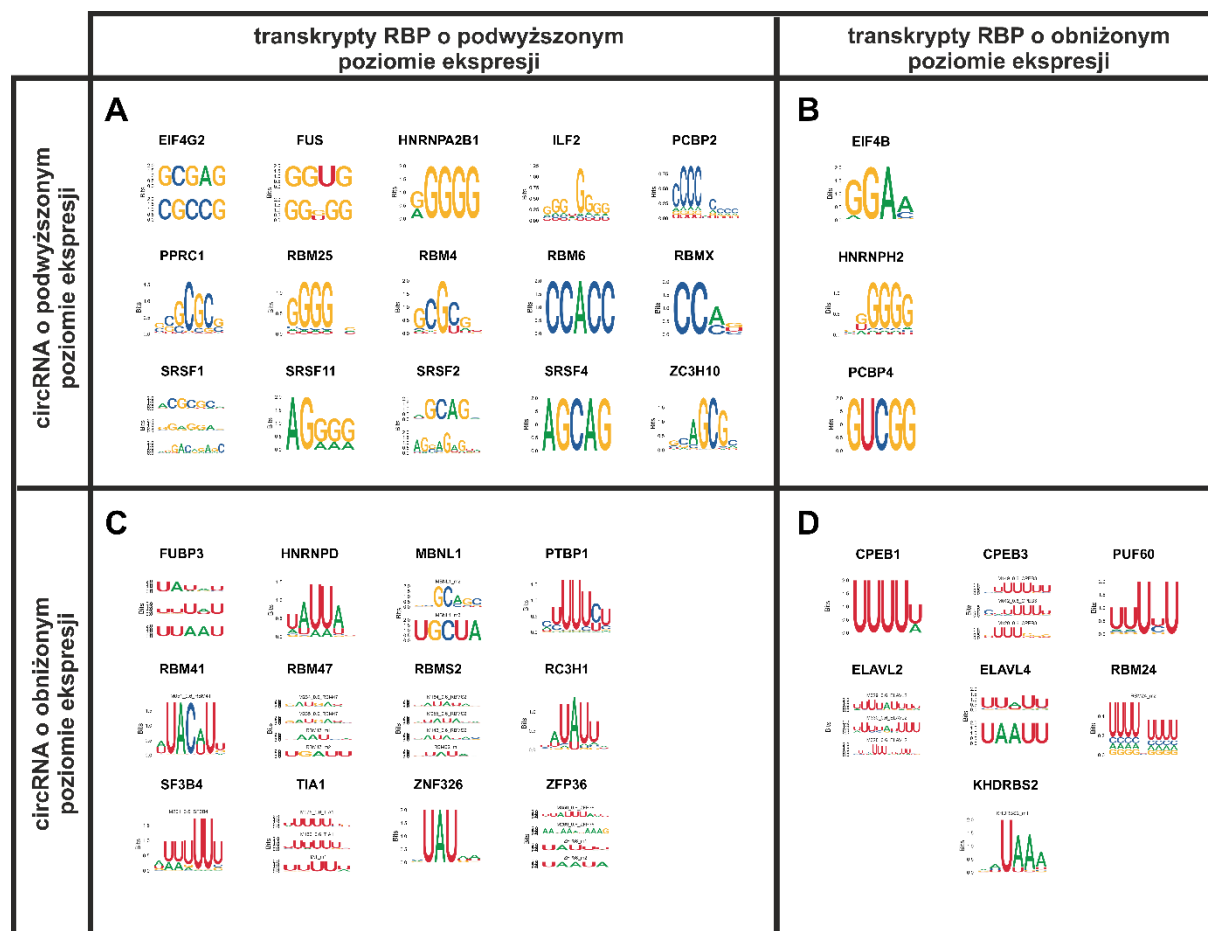
Rycina 10. Profil ekspresji transkryptów RBP w guzach GBM. A. Diagram Venna przedstawiający zależność między zidentyfikowanymi RBP w próbkach zdrowego mózgu (HB), guzach pierwotnych (GBM PRM) oraz guzach wtórnych (GBM REC). **B.** Wykres typu volcano plot ilustrujący liczbę transkryptów RBP o zmienionym profilu ekspresji w guzach GBM w porównaniu do próbek kontrolnych zdrowego mózgu. Niebieskie punkty wskazują na RBP o obniżonym poziomie ekspresji, a czerwone – RBP o podwyższonym poziomie ekspresji.

4.1.4. Analiza korelacji poziomu ekspresji kolistych RNA oraz białek wiążących RNA z uwzględnieniem potencjalnych miejsc wiązania

Doniesienia literaturowe wskazują, iż RBP wpływają na biogenezę circRNA poprzez wiązanie się z intronami oskrzydłającymi sekwencje kolistych RNA i w ten sposób promują backsplicing. Ponadto circRNA mogą wchodzić w interakcje z RBP i tym samym regulować ich funkcjonowanie [123,254]. Korzystając z danych uzyskanych na podstawie przeprowadzonego sekwencjonowania RNA wykonano analizy mające na celu określenie wzajemnej relacji między circRNA, a RBP charakteryzującymi się zmienionym profilem ekspresji w guzach GBM.

W przypadku identyfikacji potencjalnych miejsc wiązania RBP w analizie bioinformatycznej bierze się najczęściej pod uwagę sekwencje 6-nukleotydowe (tzw. 6-mery). Są one dość krótkie, jednak na tyle specyficzne, by silnie wiązać określone rodziny białek. Ponadto są one zakonserwowane ze względu na swoją istotność funkcjonalną [248]. W kontekście potencjalnego oddziaływania circRNA i RBP, zweryfikowano wzbogacenie sekwencji circRNA o zmienionym w GBM profilu ekspresji w 6-mery i porównano je z motywami wiążącymi występującymi w RBP. W ten sposób zidentyfikowano 18 białek, które

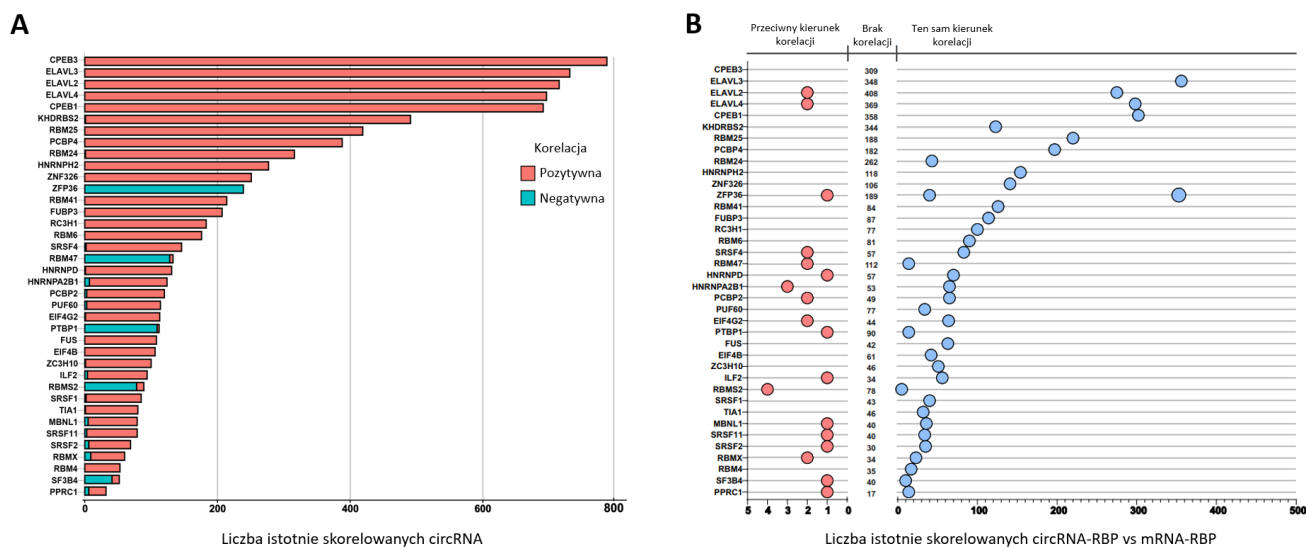
posiadały motywy wiążące dla circRNA o podwyższonym w GBM poziomie ekspresji i 19 białek z motywami wiążącymi dla circRNA o obniżonym poziomie ekspresji. Zaobserwowano, iż motywy wiążące circRNA o obniżonym poziomie ekspresji były bogate w reszty U, a motywy wiążące circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji posiadały wiele reszt G i C (Ryc. 11).



Rycina 11. Transkrypty RBP o zmienionym poziomie ekspresji z motywami wiążącymi w circRNA. **A.** RBP o podwyższonym poziomie ekspresji z motywami wiążącymi circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji. **B.** RBP o obniżonym poziomie ekspresji z motywami wiążącymi circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji. **C.** RBP o podwyższonym poziomie ekspresji z motywami wiążącymi circRNA o obniżonym poziomie ekspresji. **D.** RBP o obniżonym poziomie ekspresji z motywami wiążącymi circRNA o obniżonym poziomie ekspresji.

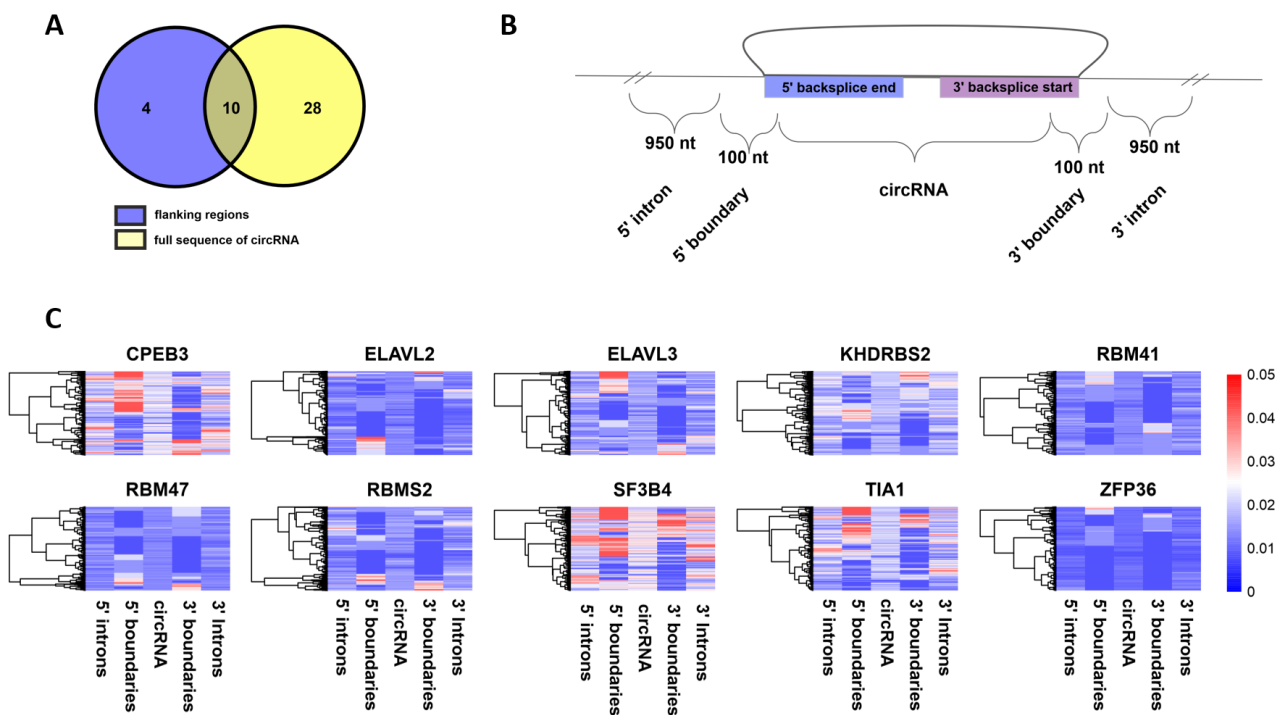
Następnie określony został współczynnik korelacji między ekspresją wcześniej zidentyfikowanych transkryptów RBP i circRNA o zmienionym w GBM profilu ekspresji. Zaobserwowano, iż poziom ekspresji niektórych transkryptów RBP jest istotnie skorelowany z ekspresją kilkuset circRNA. Zdecydowana większość RBP, takich jak białka z rodziny ELAV i CPEG wykazała dodatnią korelację, a białka takie jak ZFP36, RBM47, PTBP1,

RBM5S i SF3B4 były głównie negatywnie skorelowane z poziomem ekspresji circRNA. (Ryc. 12 A). Aby ustalić czy korelacja tych samych RBP dotyczy jedynie kolistych transkryptów, czy obejmuje również ich liniowe odpowiedniki, obliczono współczynnik korelacji dla podzbioru mRNA. Ponadto określono, czy korelacja RBP z liniowymi transkryptami posiada ten sam czy przeciwny kierunek co korelacja z ich kolistymi odpowiednikami. Mogłoby to wskazać na potencjalny udział tych białek w dyskryminacji między promowaniem klasycznego splicingu, a backsplicingu. Większość z analizowanych korelacji wykazała ten sam kierunek w przypadku circRNA jak i odpowiadających im mRNA, to znaczy zarówno kolisty jak i liniowy transkrypt był pozytywnie lub negatywnie skorelowany z poziomem RBP. Zaobserwowano jednak, że w niektórych przypadkach korelacje posiadały kierunek odwrotny, a więc poziom RBP pozytywnie skorelowany z poziomem ekspresji circRNA był jednocześnie negatywnie skorelowany z odpowiadającą mu formą liniową lub odwrotnie. Wskazywało to na potencjalny udział RBP w powstawaniu wyłącznie jednego z transkryptów i promowaniu tylko klasycznego splicingu lub jedynie backsplicingu (Ryc. 12 B).



Rycina 12. Określenie korelacji między poziomem ekspresji transkryptów RBP a circRNA i linRNA. A. Liczba circRNA o zmieniony profilu ekspresji w GBM istotnie skorelowanych z poziomem ekspresji deregulowanych transkryptów RBP. **B.** Porównanie kierunku korelacji pomiędzy RBP i circRNA (z podpunktu A) oraz korelacji RBP i odpowiadających im mRNA. RBP oznaczone kolorem niebieskim ilustrują ten sam kierunek korelacji z poziomem ekspresji circRNA i mRNA, a RBP oznaczone kolorem czerwonym wskazują kierunek przeciwny.

W celu określenia czy RBP o zmienionym profilu ekspresji mogą być zaangażowane nie tylko w biogenezę circRNA, ale również być przez nie wiązane, określono, czy istnieje wspólny podzbiór RBP, posiadających jednocześnie motywy wiążące w intronach oskrzydających sekwencje circRNA, motywy wiążące w pre-mRNA i motywy wiążące w całkowitej sekwencji circRNA. W rezultacie określono 10 takich RBP: CPEB3, ELAVL2, ELAVL3, KHDRBS2, RBM41, RBM47, RBMS2, SF3B4, TIA1, ZFP36 (Ryc. 13 A). Ponadto obliczono częstotliwość występowania motywów wiążących w regionie obejmującym BSJ, regionie 100 nt przed i 100 nt po BSJ, regionie połączeń egzon-intron oraz intron-egzon, która okazała się być podobna w przypadku większości zidentyfikowanych białek. Zaobserwowano jednak zwiększoną liczbę motywów wiążących w sekwencjach obejmujących region flankujący koniec 5' circRNA w przypadku białka CPEB3. Podobną zależność odnotowano w przypadku białka SF3B4, które dodatkowo charakteryzowała zwiększona liczba motywów w regionie oskrzydającym 3' circRNA (Ryc. 13 B-C).

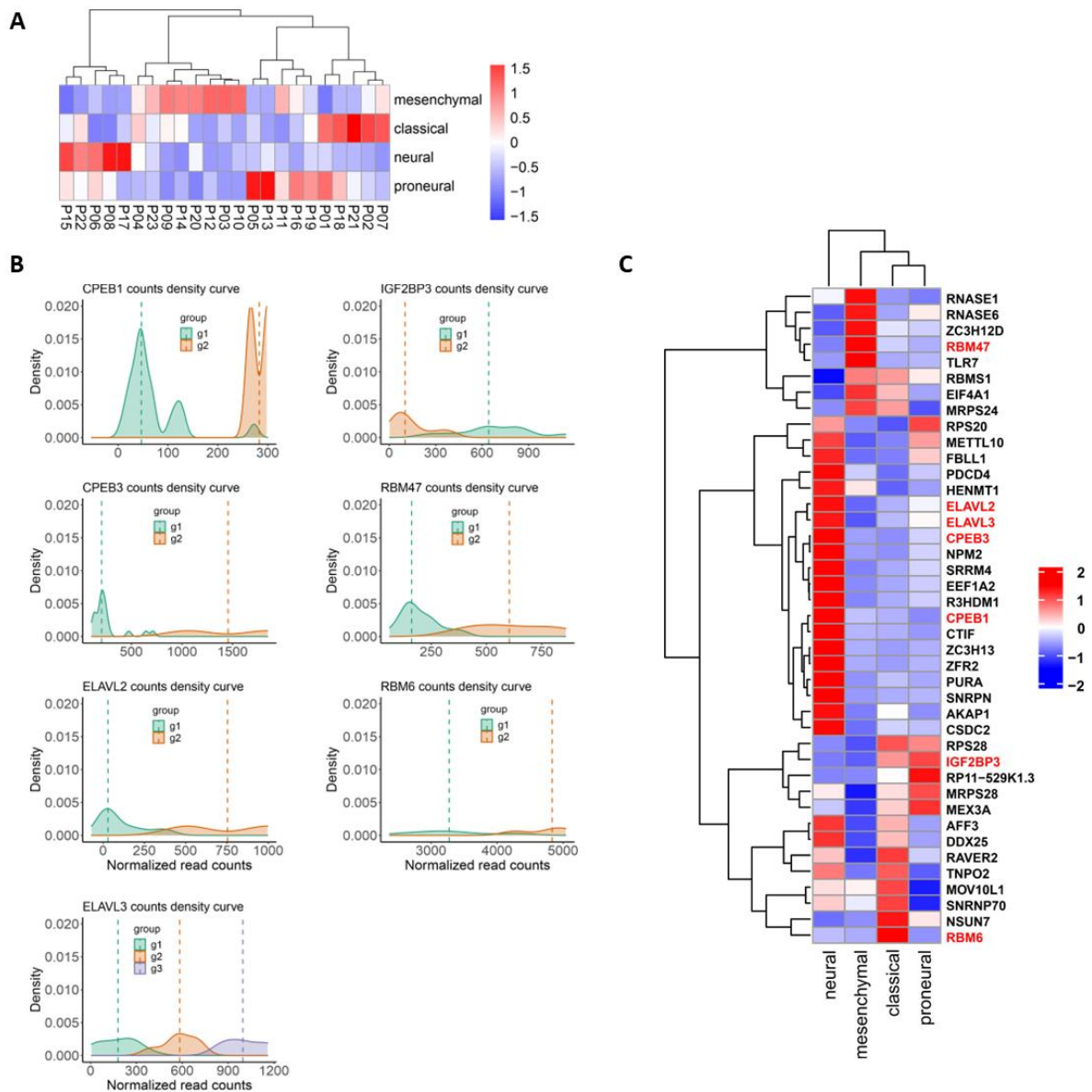


Rycina 13. Motywy RBP wiążące sekwencje circRNA oraz introny okalające sekwencję circRNA w pre-mRNA. A. Diagram Venna przedstawia zależność między liczbą RBP z motywami wiążącymi introny okalające sekwencję RNA a RBP z motywami wiążącymi w całkowitej sekwencji circRNA. **B.** Schemat ukazujący możliwe regiony wiązania się RBP. **C.** Częstotliwość występowania motywów wiążących RBP w regionach zilustrowanych w podpunkcie B.

4.1.5. Nowe podtypy oparte o profil ekspresji białek wiążących RNA

Podtypy molekularne GBM umożliwiają lepszą predykcję odpowiedzi na leczenie oraz prognozowanie całkowitego czasu przeżycia. Ponadto, dokładniejsza klasyfikacja każdego guza daje możliwość indywidualnego podejścia do każdego z pacjentów, co jest podstawą zyskującej coraz większą popularność i uznanie medycyny spersonalizowanej [255,256].

W związku z tym podjęto próbę stworzenia klasyfikacji molekularnej w oparciu o profil ekspresji transkryptów RBP, które mogłyby posłużyć jako dodatkowe elementy stratyfikacji pacjentów z GBM. W pierwszym etapie analizy poszczególne tkanki przypisano do znanych podtypów molekularnych: neuralnego (n=5), proneuralnego (n=5), klasycznego (n=5) i mezenchymalnego (n=8) (Ryc. 14 A). Następnie zidentyfikowano transkrypty RBP o zmienionym profilu ekspresji, które były w stanie segregować tkanki GBM w dwie lub więcej grup. W tym przypadku białka takie jak CPEB1, CPEB3, IGF2BP, RBM47, RBM6, ELAVL2 zdolne były do stratyfikacji próbek GBM na 2 grupy, natomiast ELAVL3 dzielił próbki na 3 grupy (Ryc. 14 B). Wszystkie spośród wymienionych RBP posiadały ponadto motywy wiążące w circRNA o zmienionym w GBM profilu ekspresji – zarówno w regionach oskrzydających sekwencje circRNA jak i w sekwencjach całego circRNA. Co ciekawe, wskazane RBP razem z 34 innymi białkami stanowią uzupełnienie stratyfikacji na wspomniane wcześniej, znane 4 podtypy molekularne (Ryc. 14 C).



Rycina 14. Stratyfikacja guzów GBM w oparciu o profil ekspresji RBP. **A.** Heatmapa przedstawia klasyfikację próbek GBM wykorzystanych w sekwencjonowaniu według podziału na podtypy molekularne. **B.** RBP z motywami wiążącymi w circRNA/regionach okalających circRNA, które zdolne są do podziału próbek GBM na 2 lub 3 nowe grupy. **C.** Heatmapa ilustruje różnice w poziomie ekspresji 41 RBP w próbkach GBM należących do różnych podtypów molekularnych.

4.2. Charakterystyka wybranych kolistych RNA

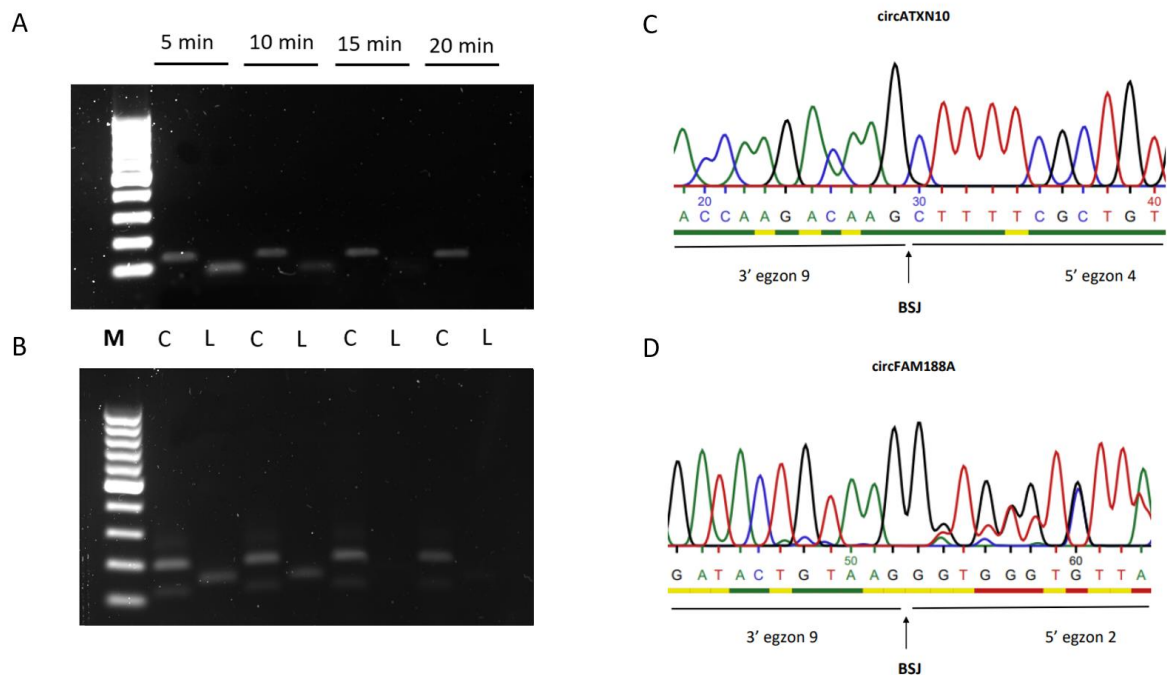
Na podstawie wyników walidacji circRNA oraz uwzględniając rolę ich liniowych odpowiedników w stanach fizjologicznych i patologicznych, do późniejszych analiz wyselekcjonowano dwie cząsteczki RNA – circATXN10 oraz circFAM188A. Oba transkrypty zostały poddane dalszym walidacjom eksperymentalnym w celu określenia ich

potencjalnej roli w GBM. Podstawowe informacje o transkryptach ATXN10 oraz FAM188A podsumowane zostały w poniższej tabeli.

Tabela 23. Ogólna charakterystyka wybranych kandydatów circRNA.

Nazwa circRNA	circATXN10	circFAM188A
ID circRNA	hsa_circ_0001246	hsa_circ_0000220
Długość	782 pz	707 pz
Koordynaty chromosomowe	chr22:46096161-46136418	chr10:15863654-15889942
Odpowiednik mRNA	ATXN10 wariant 1 NM_013236.4	FAM188A wariant 1 NM_001318330.2
Funkcja liniowego odpowiednika	ATXN10 bierze udział w funkcjonowaniu i różnicowaniu neuronów oraz w neurogenezie poprzez pobudzanie działania kinaz aktywowanych mitogenami.	FAM188A posiada domenę wiążącą kaspazy i może brać udział w apoptozie.

W następnym etapie potwierdzono kolistą strukturę obu kandydatów poprzez trawienie RNA wyizolowanego z guzów GBM za pomocą rybonukleazy R, która z wysoką wydajnością degraduje jedynie liniowe formy transkryptów. Trawienie przeprowadzono w 4 punktach czasowych: 5, 10, 15 i 20 minut. Następnie RNA zostało poddane odwrotnej transkrypcji, a uzyskane cDNA było matrycą do reakcji PCR, w której amplifikowane były zarówno transkrypty koliste jak i liniowe. Przeprowadzony eksperyment potwierdził kolistą strukturę circATXN10 i circFAM188A, które były odporne na hydrolizę, podczas gdy ich liniowe odpowiedniki ulegały całkowitej degradacji (Ryc. 15 A-B). Ponadto w celu identyfikacji unikalnej sekwencji BSJ każdego z circRNA przeprowadzono sekwencjonowanie cDNA za pomocą metody Sanger (Ryc. 15 C-D).

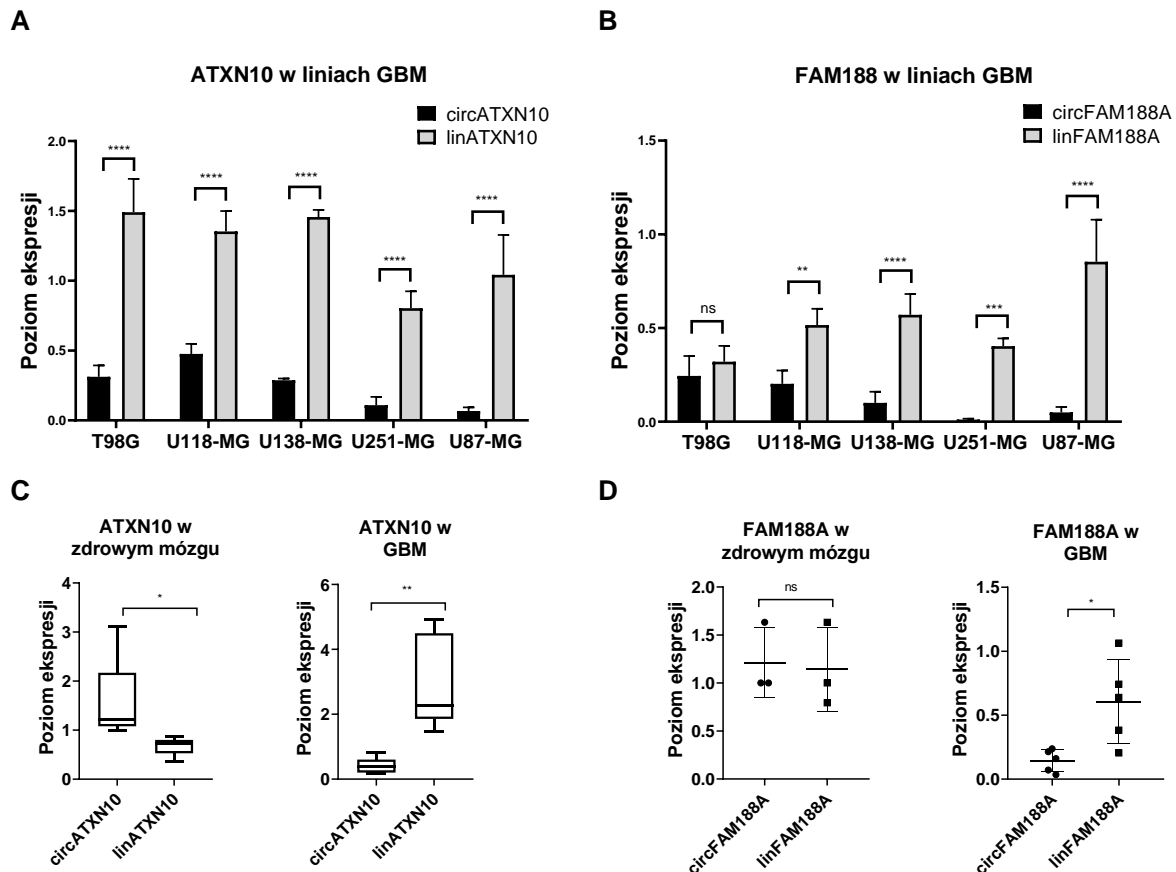


Rycina 15. Walidacja kolistej struktury wybranych kandydatów circRNA. Trawienie RNA Rnazą R i amplifikacja transkryptów ATXN10 (A) oraz FAM188A (B). M - marker wielkości, C – amplikony cząsteczki kolistej, L – amplikony cząsteczki liniowej. Chromatogram z sekwencjonowania amplikonów cząsteczek circATXN10 (C) oraz circFAM188A (D).

4.2.1. Analiza poziomu ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10 oraz FAM188A w wybranych liniach komórkowych oraz sferach

Ze względu na dużą heterogenność guzów glejaka, pierwszym etapem przed rozpoczęciem badań funkcjonalnych była selekcja najbardziej odpowiedniego modelu badawczego, jakim były linie komórkowe GBM. W tym celu, za pomocą techniki qPCR, określono poziom ekspresji wybranych transkryptów liniowych i kolistych ATXN10 i FAM188A w liniach T98G, U118-MG, U138-MG, U138-MG, U251-MG oraz U87-MG (Ryc. 16 A-B). Do dalszych badań i testów funkcjonalnych, ze względu na najniższy poziom ekspresji circRNA, wybrano linie U138-MG oraz U251-MG. Określono również poziom ekspresji wybranych transkryptów w tkankach GBM i w zdrowym mózgu. Zaobserwowano, iż forma liniowa transkryptu ATXN10 występowała w zdrowym mózgu w mniejszej liczbie niż forma kolista, natomiast stosunek ten był odwrotny w przypadku guzów GBM, gdzie forma liniowa dominowała nad formą kolistą. Warto odnotować, iż mimo obniżonego poziomu ekspresji circATXN10 w guzach GBM, bezwzględna liczba tych cząsteczek pozostawała nadal stosunkowo duża (Ryc. 16 C). W przypadku transkryptów FAM188A nie odnotowano podobnej zależności – w próbkach zdrowego mózgu obie formy występowały w

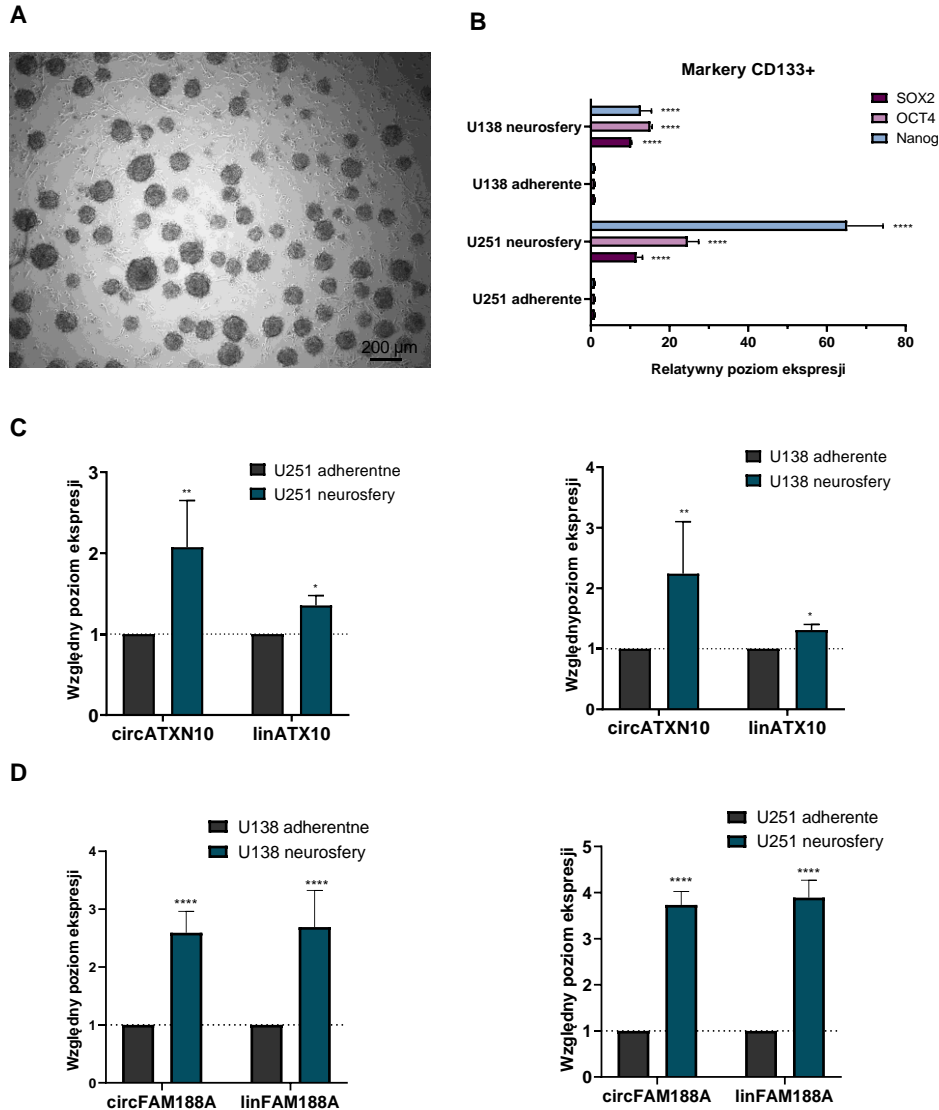
podobnej liczbie, natomiast w guzach GBM circRNA występował w mniejszej ilości niż jego liniowy odpowiednik (Ryc. 16 D).



Rycina 16. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 (A) i FAM188A (B) w liniach komórkowych GBM oraz w zdrowym mózgu i tkankach GBM (C-D). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

Sfery wyprowadzone z linii komórkowych charakteryzują się wzbogaconą subpopulacją komórek macierzystych, co umożliwia formowanie przez nie kolistych struktur 3D. Dzięki temu stanowią one atrakcyjny model badawczy, ponieważ lepiej niż linie adherentne imitują strukturę guza oraz zachodzące w nim procesy [257]. Z tego powodu, w kolejnym etapie badań, określono poziom ekspresji wybranych circRNA oraz ich liniowych odpowiedników w sferach wyprowadzonych z linii adherentnych GBM (Ryc. 17 A). W celu potwierdzenia wzbogacenia sfer w komórki CD133+ określono relatywny poziom ekspresji

markerów komórek macierzystych glejaka, takich jak SOX2, OCT4 oraz NANOG i potwierdzono ich zwiększony poziom zarówno w sferach komórek U251-MG jak i U138-MG (Ryc. 17 B). Następnie zbadano poziom ekspresji transkryptów ATXN10 i FAM188A i odnotowano, że w obu przypadkach zarówno poziom ekspresji liniowej jak i kolistej formy był znacząco zwiększony w sferach w porównaniu do linii adherentnych. W przypadku ATXN10 zaobserwowano, że poziom kolistej cząsteczki jest zwiększony o 107 % i 124 %, a liniowej o 35 % i 30 % odpowiednio w sferach U251-MG oraz U138-MG. W kontekście FAM188A odnotowano podniesienie poziomu ekspresji formy kolistej o 273 % i 171% oraz formy liniowej o 289 % i 183 % odpowiednio w sferach wyprowadzonych z linii U251-MG oraz U138-MG (Ryc. 17 C-D).

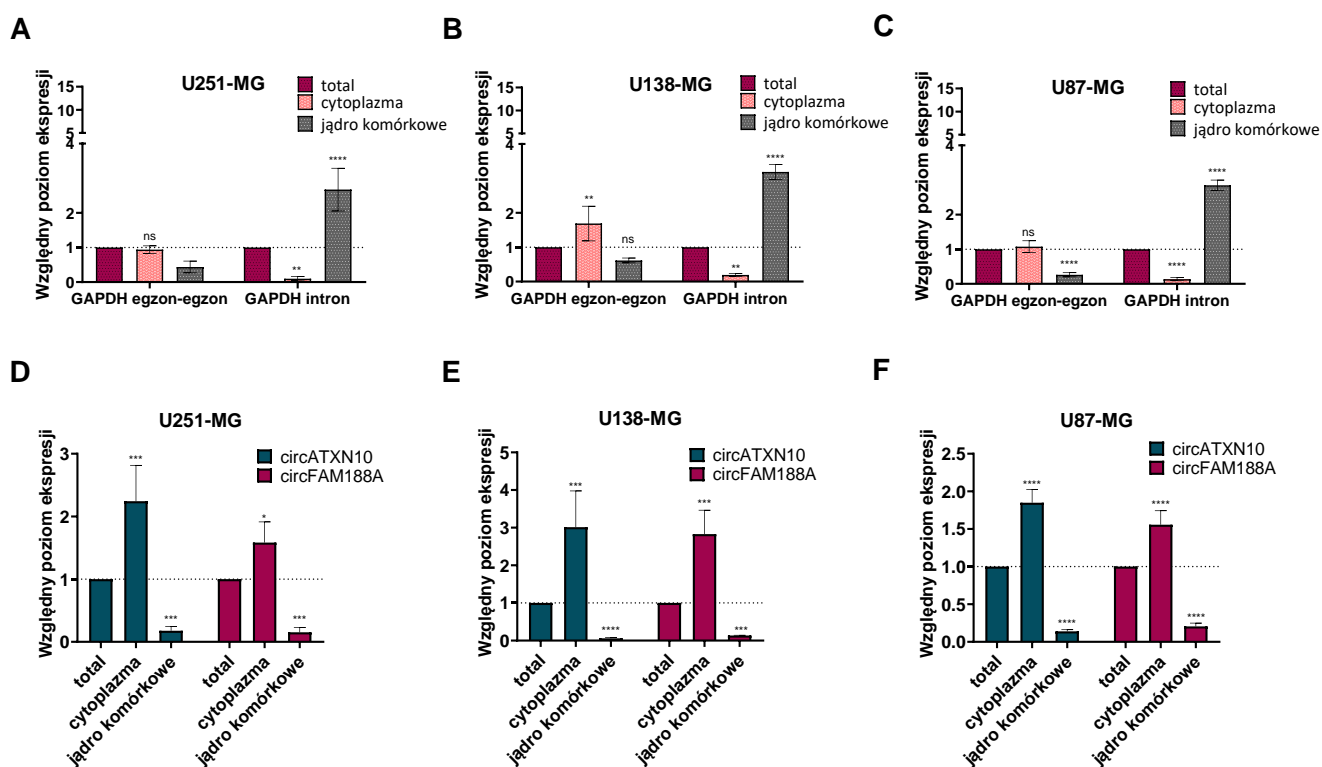


Rycina 17. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 (B) i FAM188 (C) w neurosferach. **A.** Mikroskopowy obraz neurosfer wyhodowanych z linii U138-MG. **B.** Poziom ekspresji markerów CD133+ w neurosferach. **C.** Poziom ekspresji transkryptów ATXN10 w neurosferach z linii U138-MG i U251-MG. **D.** Poziom ekspresji transkryptów FAM188A w neurosferach z linii U138-MG i U251-MG. Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych (adherentnych). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotnie statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.2.2. Określenie lokalizacji subkomórkowej wybranych kolistych RNA

Wewnątrzkomórkowe rozmieszczenie circRNA w głównej mierze decyduje o ich funkcji [258]. Dlatego też, pierwszym etapem w próbie ustalenia roli wybranych kolistych RNA w GBM było określenie ich subkomórkowej lokalizacji za pomocą frakcjonowania,

dzięki któremu możliwe jest rozdzielenie frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej. W pierwszym kroku potwierdzono poprawność przeprowadzonego eksperymentu poprzez określenie poziomu ekspresji markerów cytoplazmatycznych i jądrowych takich jak łączenie egzon-egzon i intron w GAPDH w trzech liniach GBM – U251-MG, U138-MG oraz U87-MG (Ryc. 18 A-C). Następnie określono relatywny poziom ekspresji kolistych transkryptów w każdej z frakcji i zaobserwowano, iż zarówno circATXN10 jak i circFAM188A znajdują się głównie w cytoplazmie, co zbieżne jest z ich egzonowym pochodzeniem (Ryc. 18 D-F).



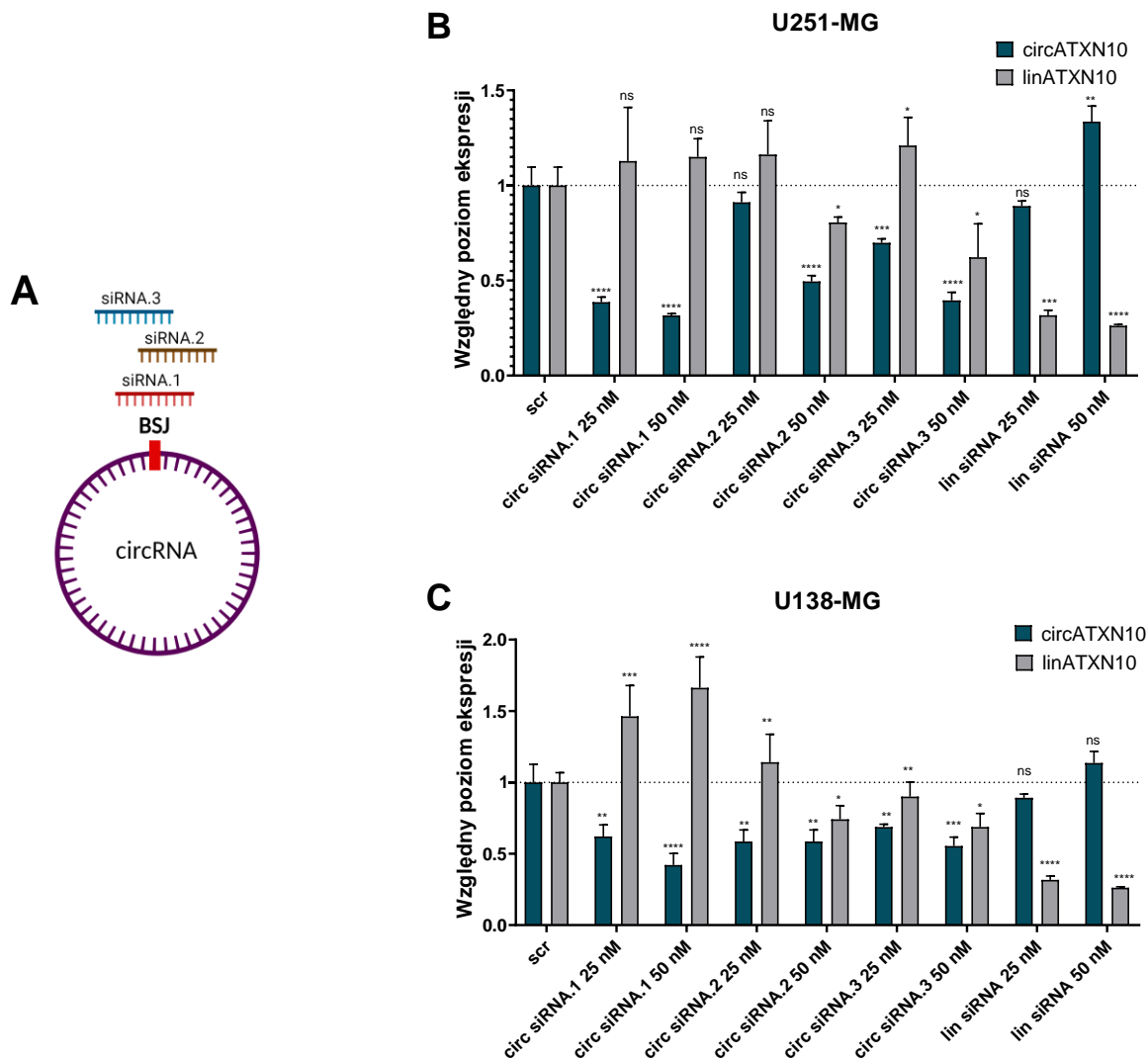
Rycina 18. Analiza poziomu ekspresji markerów jądrowych i cytoplazmatycznych po frakcjonowaniu komórek U251-MG U138-MG i U87-MG (A-C) oraz poziom kolistych transkryptów w poszczególnych frakcjach komórek U251-MG U138-MG i U87-MG (D-F). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do próbek kontrolnych (total). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3. Charakterystyka circATXN10

4.3.1. Obniżenie poziomu ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10 za pomocą siRNA

W celu określenia potencjalnej roli circATXN10 w rozwoju GBM zastosowano różnego rodzaju testy funkcjonalne. Opierały się one na podejściu typu „utrata funkcji” z wykorzystaniem siRNA oraz na podejściu typu „nabycie funkcji” z użyciem wektora ekspresyjnego. Miały one na celu obserwację zmian fenotypowych oraz ocenę modyfikacji w funkcjonowaniu komórek GBM, w których zmieniony został poziom ekspresji wybranych transkryptów.

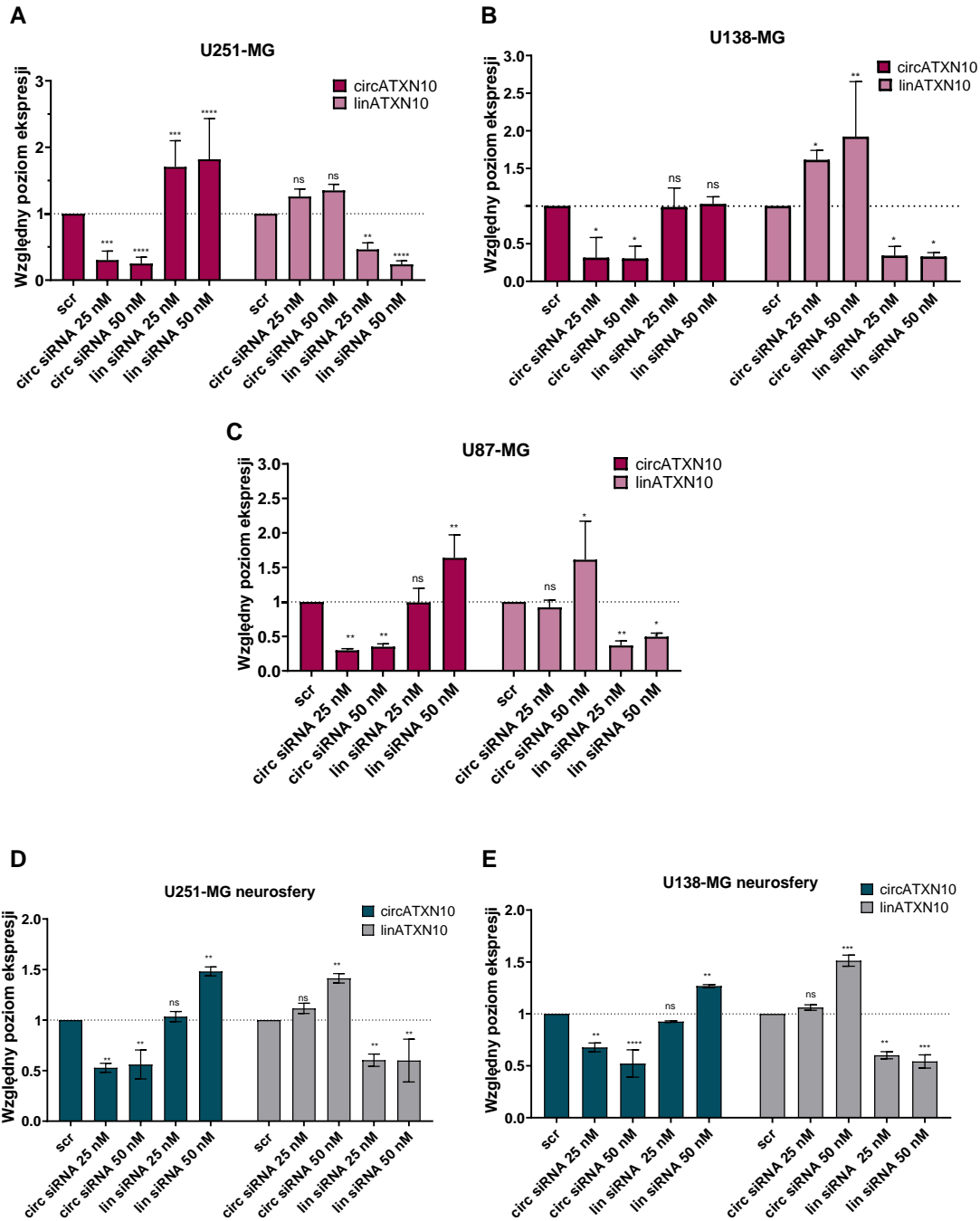
W pierwszym kroku zaprojektowano oraz przetestowano 3 różne siRNA, których sekwencja była komplementarna do regionu obejmującego BSJ w circATXN10 (Ryc. 19 A). W przypadku liniowej formy użyto gotowego siRNA komplementarnego do miejsca połączenia egzon-egzon w regionie, który nie wchodził w skład sekwencji circRNA, tak aby zastosowane obniżenie poziomu ekspresji było specyficzne dla każdego z transkryptów. Jako kontroli użyto niespecyficznego siRNA (scr, ang. *Scrambled*), który posiadał ten sam skład nukleotydowy co wybrane siRNA, ale inną sekwencję, która nie była komplementarna do żadnego znanego ludzkiego RNA. Przeprowadzona optymalizacja wskazała, iż najbardziej specyficzny i wydajny był siRNA.1, który skutecznie obniżył poziom ekspresji circATXN10 o około 60-70 % w linii U251-MG i 40-60% w linii U138-MG. Pozostałe siRNA (siRNA.2 i siRNA.3) w stężeniu końcowym 50 nM obniżały równocześnie poziom ekspresji formy liniowej, co sugerowało ich niespecyficzne wiązanie się z mRNA ATXN10, dlatego też w kolejnych eksperymentach zastosowany został siRNA.1 (Ryc. 19 B-C).



Rycina 19. Schemat projektowania siRNA (A) oraz analiza zmian poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą testowanych siRNA w liniach U251-MG (B) i U138-MG (C). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; * dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.**

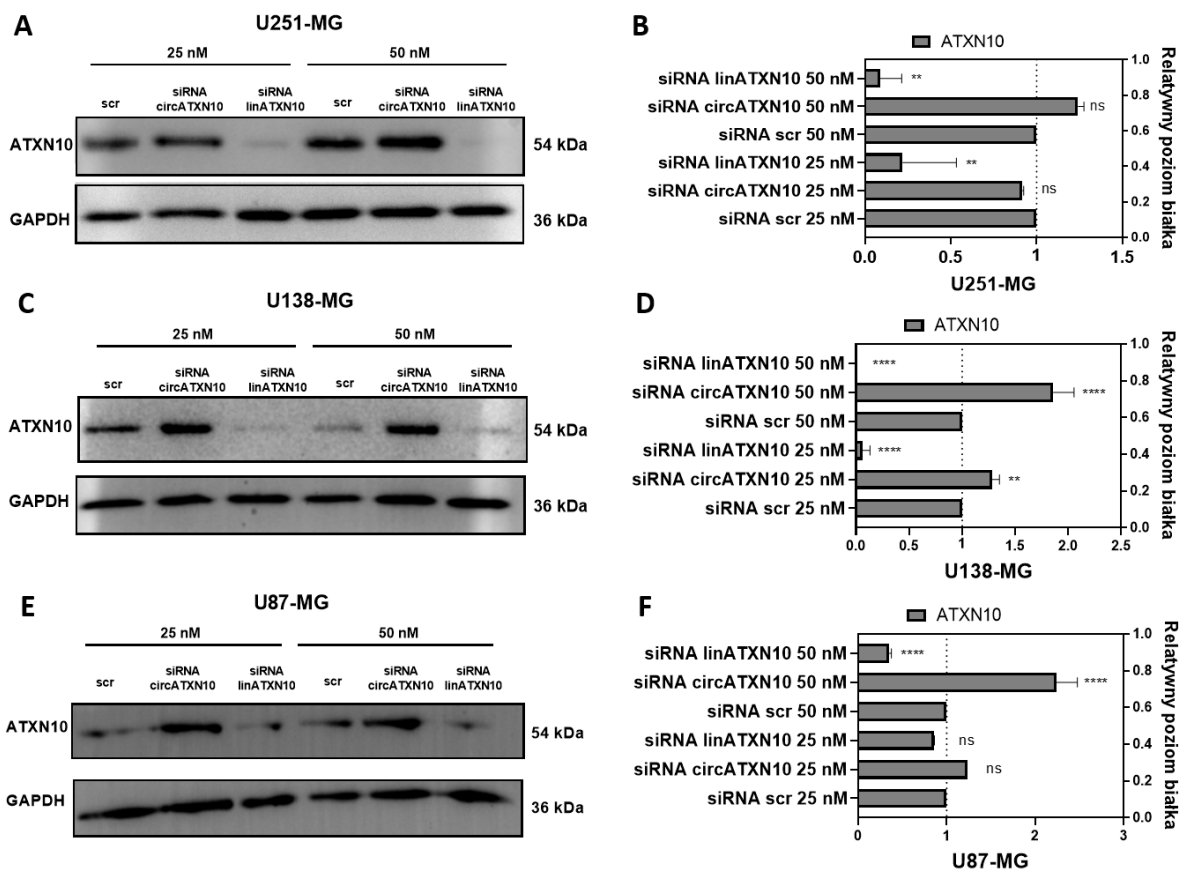
Po wykonanej optymalizacji przeprowadzono transfekcję komórek U251-MG oraz U138-MG wybranym siRNA o stężeniu końcowym 25 nM i 50 nM, a wyniki porównano do kontroli. SiRNA skutecznie obniżył poziom ekspresji circATXN10 i linATXN10 o około 50-70 %, a największą skuteczność obniżenia poziomu ekspresji zaobserwowano przy stężeniu końcowym 50 nM, dlatego też zastosowano go w późniejszych eksperymentach funkcjonalnych. Zaobserwowano, iż w przypadku linii U251-MG przy obniżaniu poziomu

ekspresji formy liniowej, poziom ekspresji formy kolistej ulegał zwiększeniu, podczas gdy wyciszenie formy kolistej nie wpływało istotnie na poziom ekspresji formy liniowej (Ryc. 20 A-B). W linii U138-MG poziom ekspresji formy kolistej nie ulegał zmianie przy obniżeniu poziomu ekspresji formy liniowej, za to forma liniowa ulegała zwiększonej ekspresji przy wyciszeniu circATXN10. W związku z różnymi obserwacjami przeprowadzono dodatkowy eksperyment typu „utrata funkcji” w trzeciej linii komórkowej – U87-MG. Tym razem zaobserwowano wzajemnie zwiększony poziom ekspresji każdego z transkryptów (o około 40 %) w przypadku obniżenia poziomu ekspresji przeciwnego z nich (Ryc. 20 C). Linia U87-MG jest linią najbardziej wzbogaconą w subpopulację komórek macierzystych glejaka, w związku z czym jest zdolna do samoistnego tworzenia sfer. Ponadto wcześniej uzyskane wyniki wskazały na zwiększony poziom circATXN10 i linATXN10 w sferach wyprowadzonych z linii GBM, co mogło sugerować zależność między GSC, a oboma transkryptami. Dlatego też przeprowadzono dodatkowy eksperyment z użyciem siRNA na sferach wyprowadzonych z linii U251-MG oraz U138-MG. W tym przypadku zaobserwowano tę samą zależność co w przypadku komórek U87-MG – forma kolista ulegała zwiększonej ekspresji przy wyciszaniu formy liniowej i na odwrót (Ryc. 20 D-E).



Rycina 20. Analiza zmian poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą siRNA w liniach U251-MG (A), U138-MG (B), U87-MG (C), sferach U251-MG (D) oraz sferach U138-MG (E). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; * dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.**

W kolejnym kroku, za pomocą techniki western blot, określono poziom białka ATXN10 po obniżeniu poziomu ekspresji kolistego i liniowego transkryptu z użyciem specyficznych siRNA. Wyniki potwierdziły wcześniej zaobserwowane zmiany w poziomach ekspresji poszczególnych transkryptów. W przypadku linii U251-MG nie zmienił się poziom białka ATXN10 w próbkach z obniżonym poziomem ekspresji circATXN10, natomiast w linii U138-MG oraz U87-MG odnotowano zwiększony poziom białka ATXN10 po wyciszeniu formy kolistej, tam samo jak w przypadku zmian zaobserwowanych wcześniej na poziomie RNA. Potwierdziło to podwyższenie poziomu ekspresji nie tylko mRNA ATXN10, ale także białka ATXN10 po wyciszeniu formy kolistej. Ponadto potwierdzono skuteczne obniżenie poziomu białka ATXN10 poprzez zastosowanie siRNA komplementarnego do transkryptu linATXN10 (Ryc. 21).

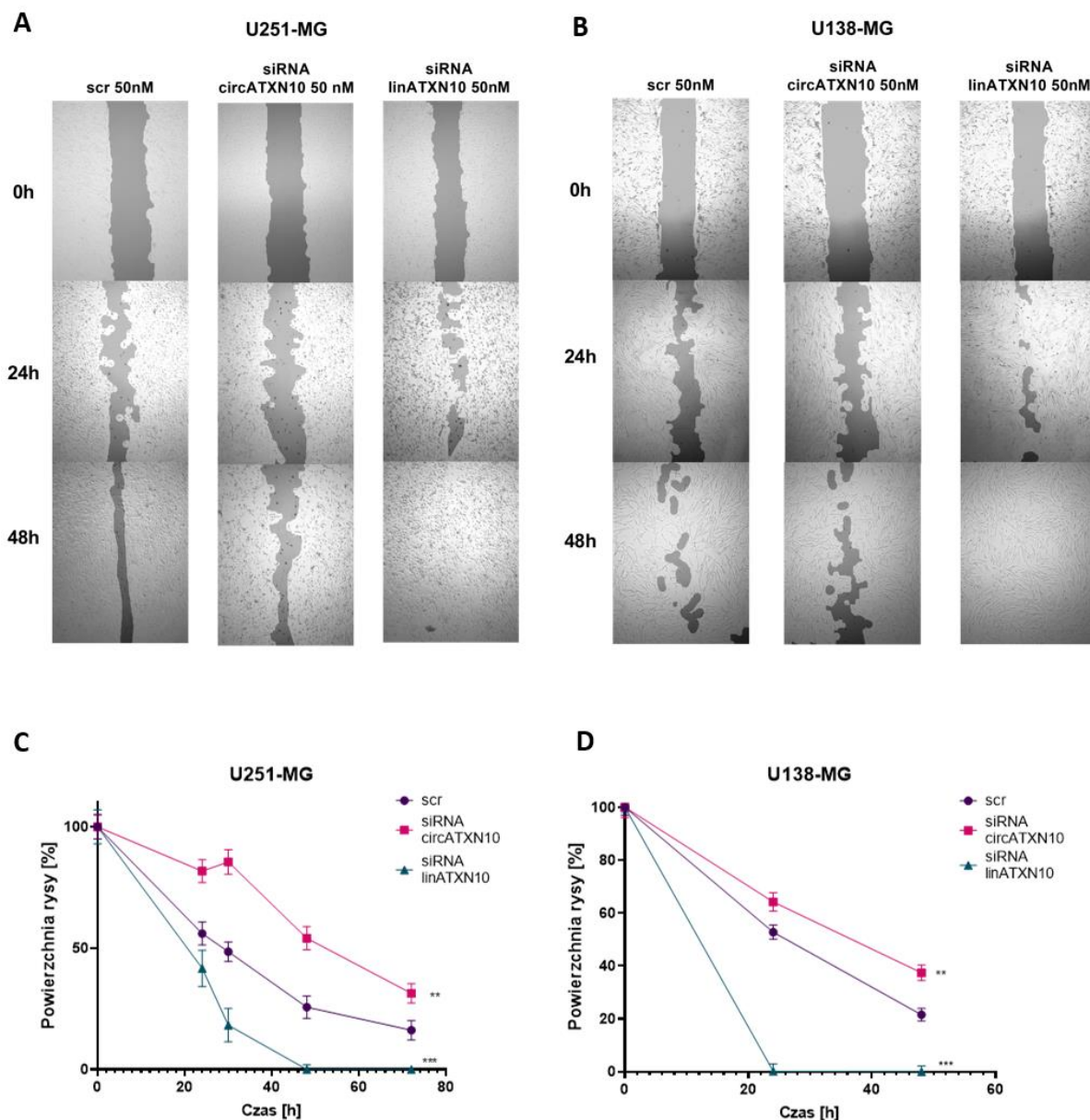


Rycina 21. Analiza zmian poziomu białka ATXN10 po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą siRNA w liniach U251-MG (A-B), U138-MG (C-D) oraz U87-MG (E-F). Wyniki znormalizowano do poziomu białka GAPDH i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu One-Way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a.: ns – nieistotnie statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.1. Badanie tempa migracji komórek za pomocą testu zarastania rany

Komórki nowotworowe posiadają zdolność do unikania sygnałów hamujących wzrost i cechują się zwiększonym tempem proliferacji. Zdolność masy nowotworowej do wzrostu wiąże się jednak nie tylko z nadmierną proliferacją komórek, ale także z ich migracją co wpływa na proces naciekania otaczających guz zdrowych tkanek. Biorąc pod uwagę potencjalną rolę transkryptów ATXN10 w procesach związanych z rozwojem GBM określono wpływ zmiany poziomu ekspresji circATXN10 i linATXN10 na właściwości migracyjne komórek GBM. Zmiany tempa oceniono w teście zarastania rany po obniżeniu poziomu ekspresji formy kolistej i liniowej ATXN10 za pomocą siRNA w stężeniu końcowym 50 nM w linii U251-MG oraz U138-MG. Obie wymienione linie komórkowe przylegają do powierzchni naczynia hodowlanego tworząc adherentną monowarstwę. Linia U87-MG natomiast, w normalnych warunkach, samoistnie formuje sfery tworząc kulturę 3D. Dlatego też, ze względów technicznych, nie zastosowano jej w zaprezentowanych testach funkcjonalnych - mając na uwadze trójwymiarowy charakter tej linii wykonanie wielu eksperymentów z jej użyciem jest znacznie utrudnione lub niemożliwe.

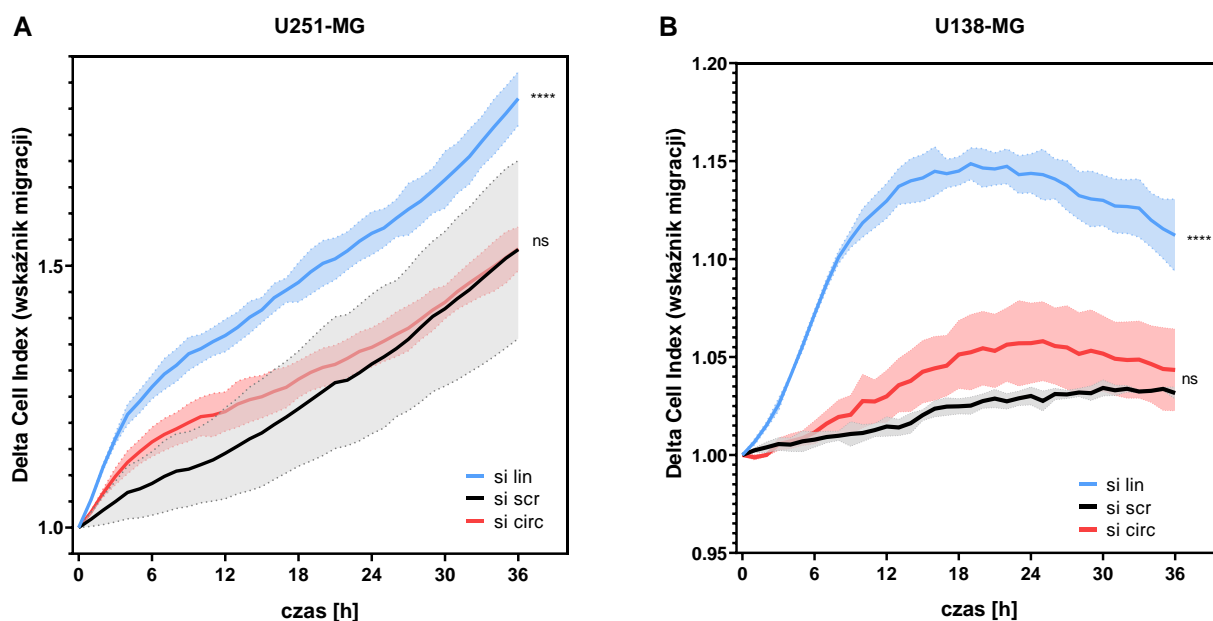
Zaobserwowano, iż tempo migracji znacznie wzrasta w przypadku obniżenia poziomu ekspresji formy liniowej w porównaniu do kontroli, natomiast obniża się przy wyciszeniu formy kolistej (Ryc. 22). Po wyciszeniu formy liniowej największa otwarta powierzchnia rany wynosiła 0,17 % i 0,0016 % w porównaniu do pierwotnej powierzchni w U138-MG oraz 0 % i 0 % w U251-MG, odpowiednio po 48 i 72 godzinach. Po wyciszeniu formy kolistej największa otwarta powierzchnia wynosiła 64,18 % i 37,42 % w porównaniu do pierwotnej powierzchni rany w U251-MG oraz 54,07 % i 31,39 % w U138-MG, odpowiednio po 48 i 72 godzinach. Obserwacje te wskazały, iż obniżenie poziomu ekspresji formy liniowej powoduje zwiększoną migrację komórek GBM, a obniżenie poziomu ekspresji formy kolistej ATXN10 – zmniejszoną migrację. Wyniki te w połączeniu z zależnością między zmianami poziomów ekspresji obu form wskazały, iż circATXN10 i lin ATXN10 charakteryzują się potencjalnie przeciwstawnym działaniem.



Rycina 22. Analiza zmian tempa migracji komórek GBM po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 za pomocą siRNA. A-B. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe przedstawiające szybkość migracji komórek U251-MG (A) oraz U138-MG (B) po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10. Fotografie wykonywano co 24 h, aż do całkowitego zarośnięcia rany w komórkach traktowanych kontrolnym siRNA (scr). **C-D.** Tempo migracji komórek ocenione na podstawie zmian w powierzchni rysy w komórkach U251-MG (C) oraz U138-MG (D). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.2. Badanie tempa migracji komórek za pomocą systemu xCELLigence

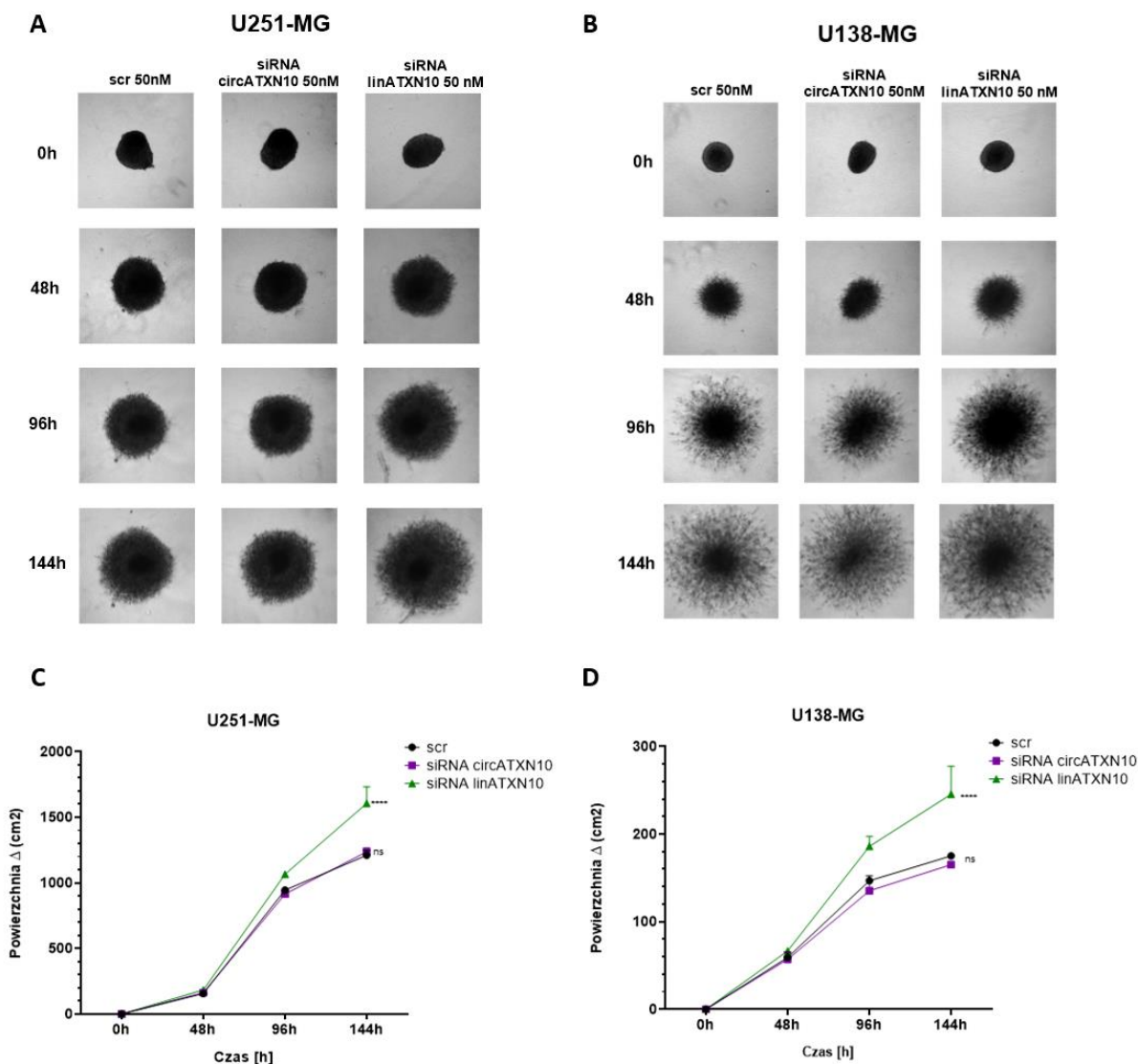
W celu potwierdzenia obserwacji dokonanych na podstawie testu zarastania rany wykonano badanie tempa migracji komórek za pomocą systemu xCELLigence. W przypadku tej metody, komórki wysiane na płytce zawierającej złotą elektrodę i dwukomorowe dołki, migrują z górnej komory, w której znajduje się niesuplementowana pożywka, do komory dolnej zawierającej chemoatraktant. Dzięki temu możliwy jest pomiar szybkości migracji komórek poprzez rejestrowanie zmian w oporze elektrycznym. Poniższy wykres przedstawia zmiany w jednostce indeksu komórek co odpowiada zmianom tempa migracji komórek. Wskazuje on na zwiększony potencjał migracyjny po wyciszeniu formy liniowej ATXN10 (około 20% w linii U251-MG oraz 10% w linii U138-MG), podczas gdy tempo migracji po wyciszeniu formy kolistej nie uległo istotnej statystycznie zmianie w porównaniu do komórek kontrolnych (Ryc. 23).



Rycina 23. Wpływ obniżenia poziomu ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10 na potencjał migracyjny komórek U251-MG (A) oraz U138(MG). Migracja została zbadana za pomocą systemu xCELLigence, pomiarów dokonywano przez 36 h, a pierwszy pomiar wykonany został 48 h po transfekcji komórek za pomocą siRNA o stężeniu końcowym 50 nM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.3. Badanie tempa inwazji za pomocą testu formowania sfer

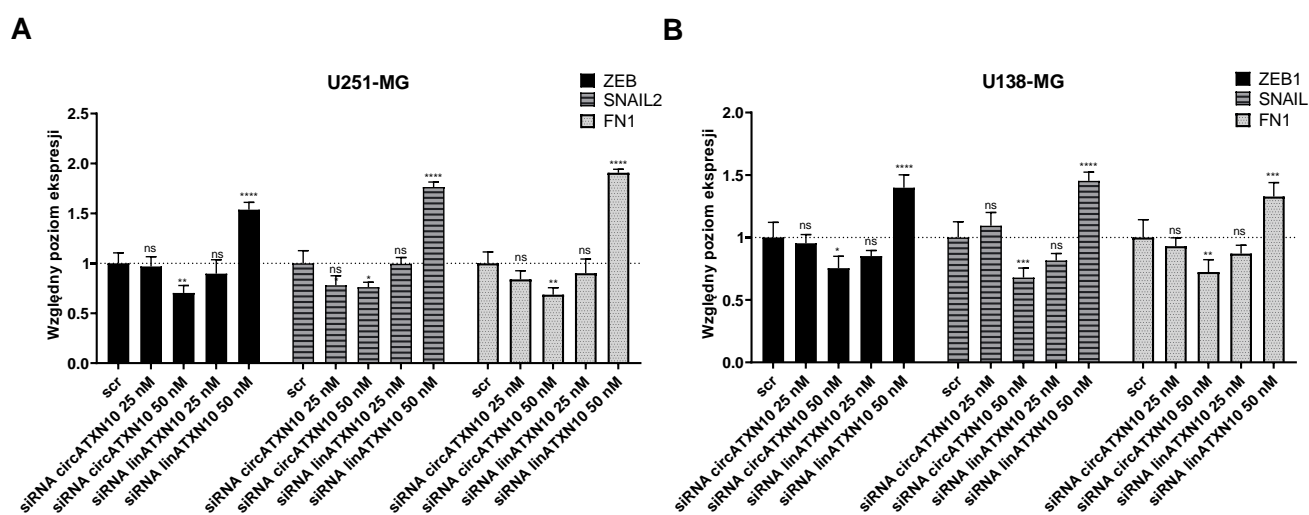
Zdolność nowotworu do tworzenia przerzutów jest ściśle związana z procesem inwazji, który obok proliferacji i migracji jest jednym z najważniejszych mechanizmów odpowiedzialnych za agresywność guza. Duże znaczenie w tym procesie mają komórki macierzyste guza, które charakteryzują się nieograniczonym potencjałem proliferacyjnym, a także zdolnością do samoodnawiania się [259]. W celu określenia roli transkryptów ATXN10 w opisanym procesie przeprowadzono test inwazji sfer. W tym celu po transfekcji komórek za pomocą siRNA wysiano je na płytkę 96-dółkową, a następnie pokryto matrygelem i obserwowano inwazję komórek GBM. W przypadku próbek z obniżonym poziomem ekspresji linATXN10 tempo inwazji było znacząco zwiększone – średnio o 28 % w przypadku linii U251-MG i około 40 % w linii U138-MG. W próbkach z wyciszeniem circATXN10 nie zaobserwowano natomiast istotnej statycznie zmiany w porównaniu do próbek traktowanych kontrolnym siRNA (Ryc. 24).



Rycina 24. Analiza zmian tempa inwazji po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 za pomocą siRNA. A-B. Reprezentatywne obrazy mikroskopowe przedstawiające zmiany objętości sfer z komórek U251-MG (A) oraz U138-MG (B) po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10. Fotografie wykonywano co 48 h. **C-D.** Tempo formowania sfer ocenione na podstawie pomiarów zmian powierzchni sfer U251-MG (C) oraz U138-MG (D). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.4. Określenie poziomu ekspresji markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego

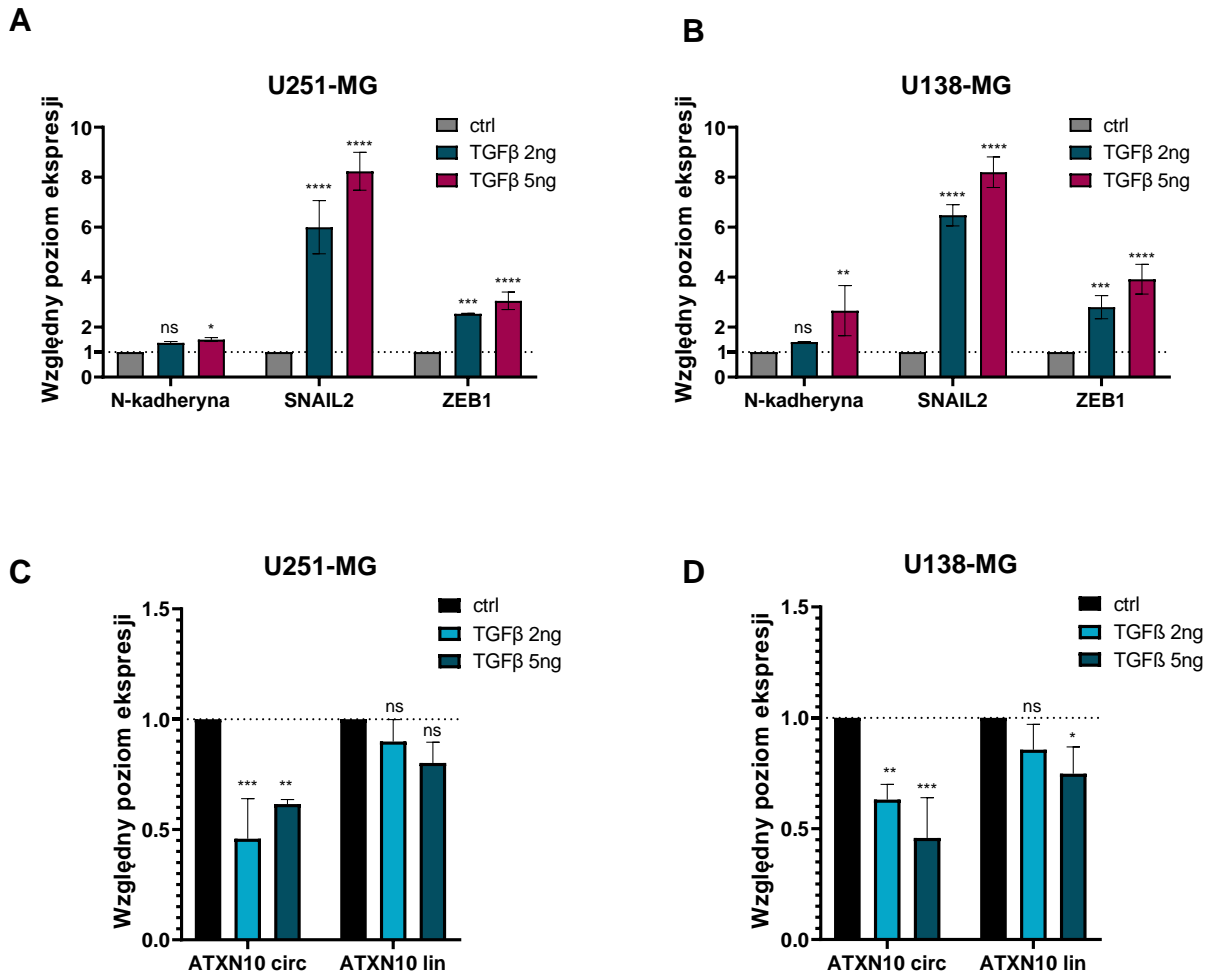
W celu walidacji wyników związanych z potencjałem migracyjnym i inwazyjnym komórek GBM po obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów ATXN10, określono poziom ekspresji wybranych markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego, jakimi są ZEB1, SNAIL2 oraz FN1. Zaobserwowano, iż poziom ekspresji każdego z markerów był istotnie zwiększony (od 50 do 90 % w linii U251-MG oraz od 30 do 40% w linii U138-MG) po zastosowaniu siRNA o stężeniu końcowym 50 nM, który obniżał poziom ekspresji liniowej formy ATXN10. W przypadku circATXN10 zaobserwowano z kolei obniżenie poziomu ekspresji markerów w porównaniu do kontroli zarówno w linii U251-MG (o około 30 %) jak i U138-MG (o około 25 %), co potwierdziło przeciwstawne działanie obu transkryptów oraz ich wpływ na przebieg EMT (Ryc. 25).



Rycina 25. Analiza zmian poziomu ekspresji markerów przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą siRNA w liniach U251-MG (A) oraz U138-MG (B). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.5. Określenie poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po indukcji TGFβ

Transformujący czynnik wzrostu beta (TGFβ ang. *Transforming growth factor β*) jest istotnym elementem rozwoju nowotworu, ponieważ aktywuje transformację komórek nabłonka w komórki mezenchymalne, a więc jest kluczowy dla indukcji EMT. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki, które wskazały na zmianę poziomu ekspresji markerów EMT pod wpływem wyciszenia circATXN10 oraz linATXN10, określono poziom obu tych transkryptów po indukcji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego w komórkach U251-MG i U138-MG za pomocą TGFβ w stężeniu 2 ng oraz 5 ng. W pierwszym kroku zweryfikowano wystąpienie EMT w komórkach traktowanych TGFβ poprzez określenie poziomu ekspresji wybranych markerów (Ryc. 26 A-B). Otrzymane wyniki wskazały na obniżenie poziomu ekspresji circATXN10 w obu liniach o około 40 %, podczas gdy poziom formy liniowej pozostawał bez istotnych zmian. Wyjątkiem były komórki traktowane TGFβ w stężeniu 5 ng w linii U138-MG, gdzie zaobserwowano istotne statystycznie obniżenie poziomu ekspresji formy liniowej o około 25 % w porównaniu do komórek nietraktowanych markerów (Ryc. 26 C-D). Poniższe oraz wcześniej otrzymane wyniki potwierdziły potencjalną rolę obu transkryptów w procesie EMT oraz mechanizmach związanych z inwazją i migracją.

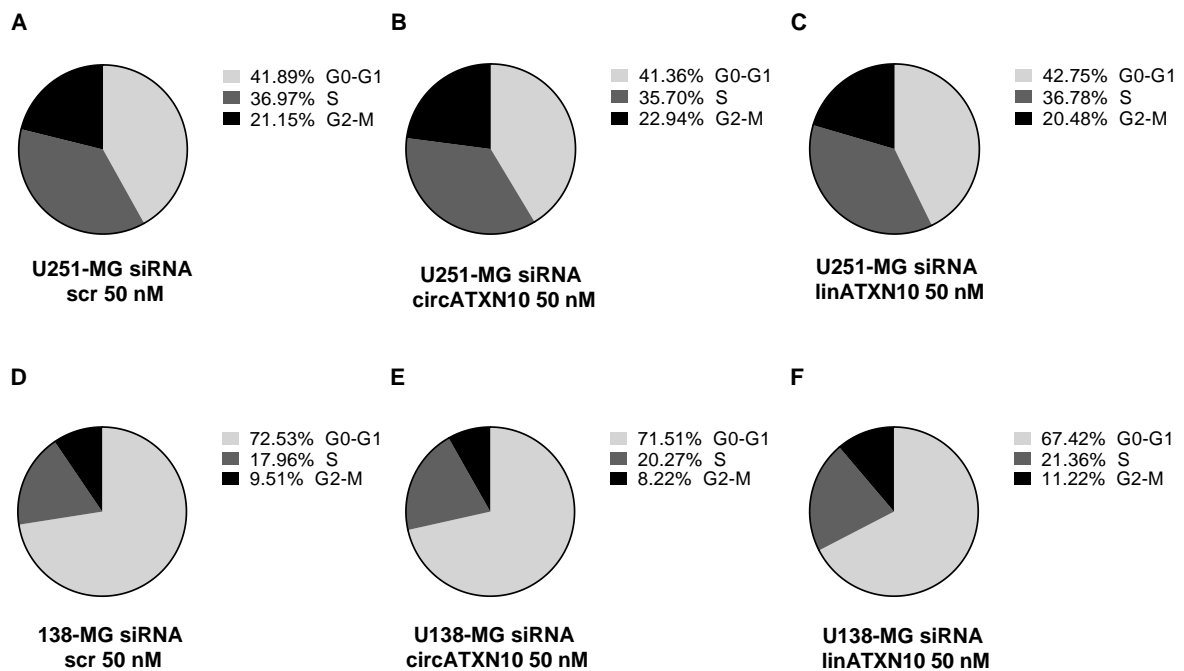


Rycina 26. Analiza zmian poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po indukcji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego za pomocą TGFβ. Poziom ekspresji markerów EMT w komórkach U251-MG (A) oraz U138-MG (B) traktowanych różnymi stężeniami TGFβ. **C-D.** Poziom ekspresji circATXN10 i linATXN10 w komórkach U251-MG (C) oraz U138-MG (D) traktowanych różnymi stężeniami TGFβ. Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości ± SD w odniesieniu do nietraktowanych komórek kontrolnych (ctrl). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.3.1.6. Badanie przebiegu cyklu komórkowego

Cykl komórkowy polega na przechodzeniu komórek przez określone fazy, takie jak faza G1 (okres przedreplikacyjny), faza S (synteza DNA), faza G2 (okres przed podziałem) i faza M (mitoza). Zmiana faz jest ściśle regulowana przez różnego rodzaju białka kontrolne cyklu komórkowego. Liczne mutacje genetyczne obecne w komórkach nowotworowych mogą prowadzić do utraty kontroli nad cyklem, co prowadzi do nadmiernej proliferacji. Zaburzenia w dystrybucji komórek w cyklu komórkowym są zatem jednym z kluczowych

aspektów, które przyczyniają się do niekontrolowanego wzrostu guza. W celu zbadania wpływu obniżenia poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 na cykl komórkowy, za pomocą cytometru przepływowego, określono przebieg cyklu komórkowego dla linii U251-MG oraz U138-MG po transfekcji siRNA w stężeniu końcowym 50 nM. Zarówno w przypadku wyciszenia formy liniowej jak i kolistej nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic w porównaniu do kontroli, co wskazywać może, iż transktypty ATXN10 nie biorą udziału w kontroli nad podziałami komórkowymi w GBM (Ryc. 27).

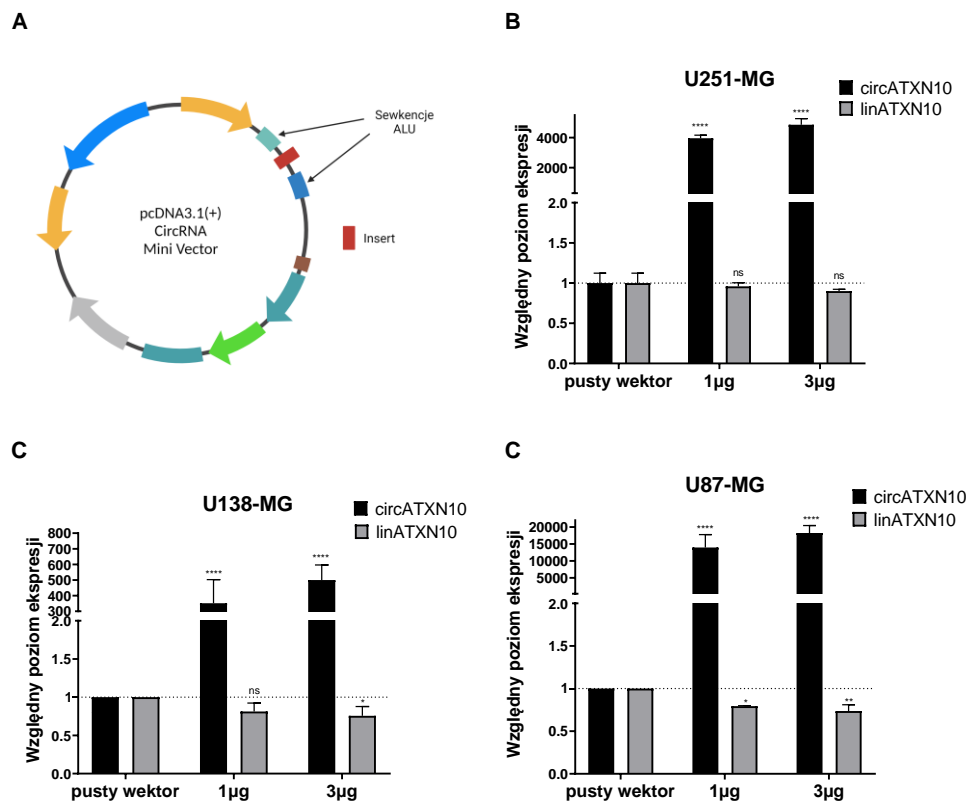


Rycina 27. Analiza rozkładu komórek w cyklu komórkowym po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą siRNA w liniach U251-MG (A-C) oraz U138-MG (D-F). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek traktowanych siRNA kontrolnym (scr) Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego. Uzyskane wyniki nie były istotne statystycznie.

4.3.2. Podwyższenie poziomu ekspresji kolistej formy ATXN10 za pomocą wektora

Wyniki wcześniej przeprowadzonych badań wskazały na zależność między poziomami ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10. W celu jej potwierdzenia wykonano eksperyment typu „nabycie funkcji” z wykorzystaniem wektora ekspresyjnego. Wektor ten posiadał sekwencje Alu, które są odwrotnie powtórzonymi sekwencjami wzmagającymi w warunkach fizjologicznych procesy cyrkularyzacji podczas backsplicingu. Sekwencje Alu

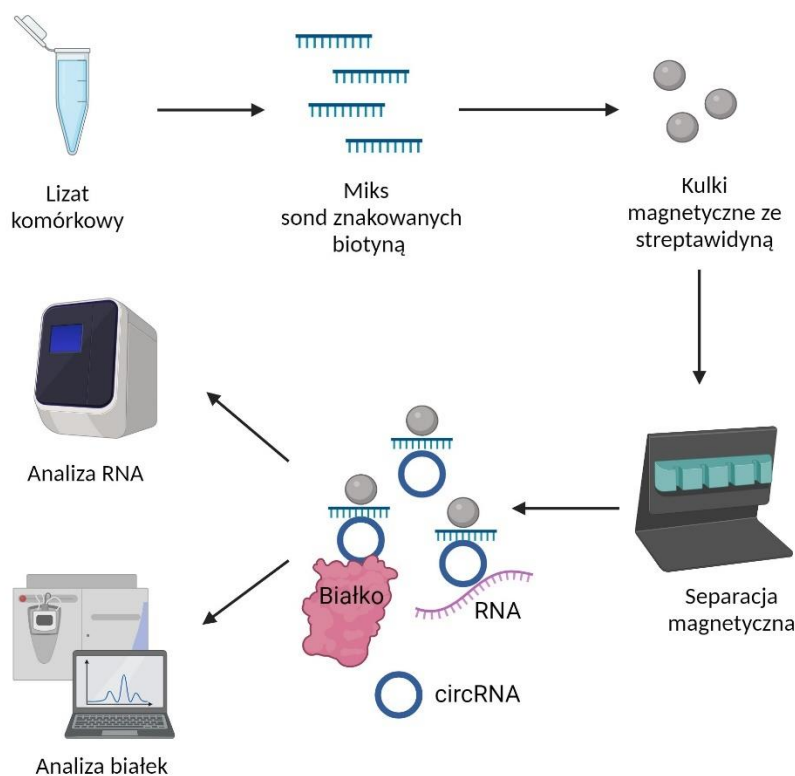
znajdują się w regionach oskrzydlających miejsce, w które wklonowano insert będący pełną sekwencją circRNA. Sekwencje Alu są wobec siebie komplementarne, co powoduje zbliżanie się końców 5' i 3' circRNA oraz ich kowalencyjne wiązanie [260]. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po transfekcji komórek GBM za pomocą wektora (w stężeniu 1 μ g oraz 3 μ g) wykazała, iż circATXN10 ulegał wydajnej nadekspresji sięgającej średnio 400000 %, 80000 % oraz 15000000 % odpowiednio w linii U251-MG, U138-MG i U87-MG. Ponadto zaobserwowano, iż poziom ekspresji liniowej formy ATXN10 przy nadekspresji circATXN10 był istotnie obniżony w linii U138-MG (o około 20%) oraz U87-MG (o około 30%), a niezmienny w przypadku linii U251-MG (Ryc. 28). Wyniki te potwierdziły wcześniejsze obserwacje dotyczące zależności między poziomem ekspresji linATXN10 przy manipulacji poziomem circATXN10 w kontekście linii U138-MG oraz U87-MG, a także brak tej zależności w przypadku linii U251-MG.



Rycina 28. Analiza zmian poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 po podwyższeniu poziomu ekspresji circATXN10 za pomocą wektora w liniach U251-MG (A), U138-MG (B) oraz U87-MG (C). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych pustym wektorem. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

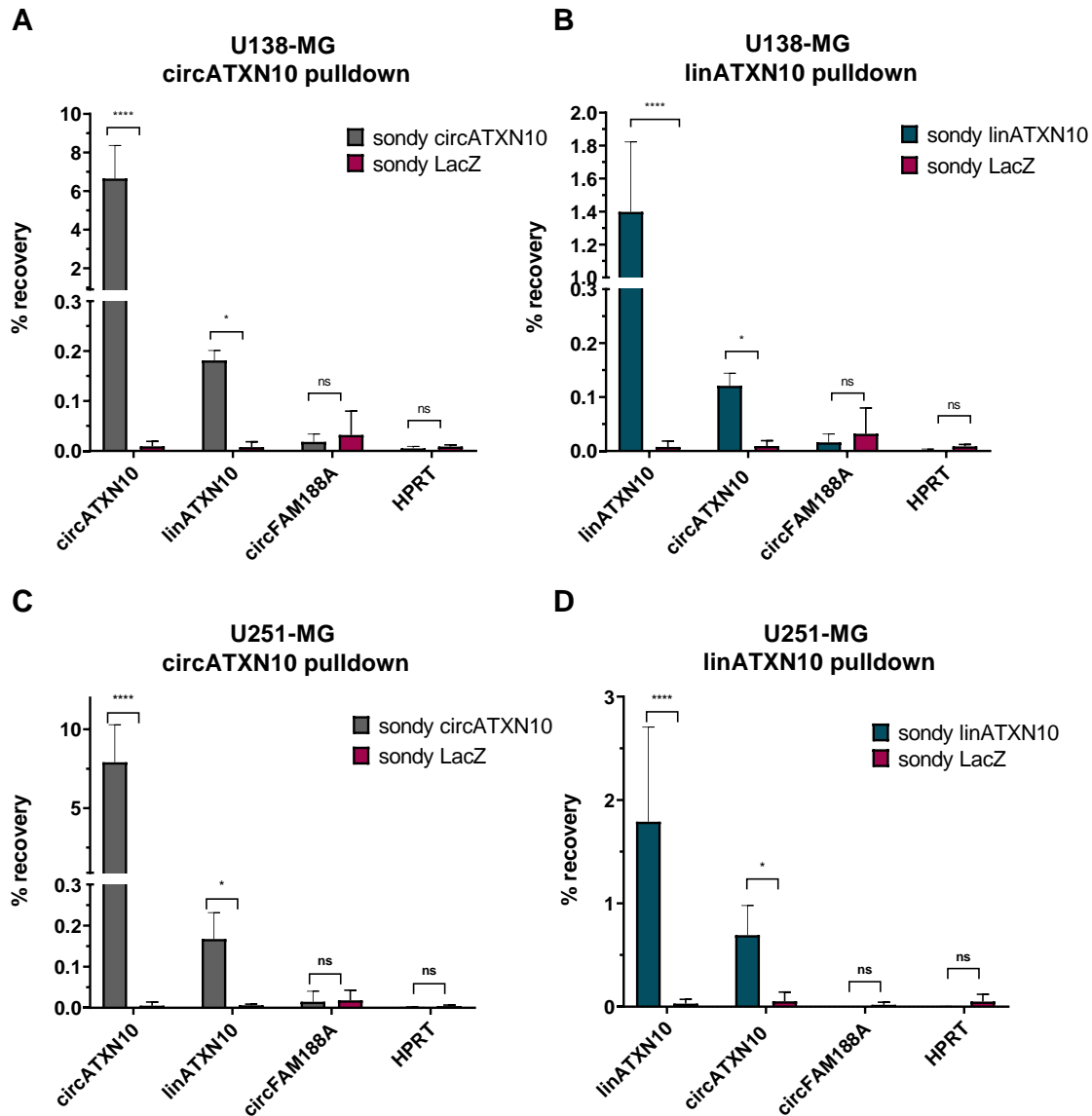
4.3.3. Identyfikacja cząsteczek wchodzących w interakcję z kolistą i liniową formą AXTN10 za pomocą eksperymentu typu „pulldown”

We wcześniej przeprowadzone badania wskazały na potencjalną zależność między ekspresją kolistej i liniowej formy AXTN10. W związku z tym przeprowadzono eksperyment typu „pulldown”, w celu potwierdzenia potencjalnej interakcji pomiędzy obydwoma transkryptami. W tym celu zaprojektowano sondy ASO znakowane biotyną na 3’ końcu, które były komplementarne do sekwencji BSJ w przypadku circATXN10 oraz komplementarne do sekwencji obejmujących łączenie egzon-egzon w linATXN10. Liczba zastosowanych sond uzależniona była od długości cząsteczki – na każde 200 nukleotydów przypadała jedna sonda, a do eksperymentu użyto mieszaniny wszystkich ASO. Kompleksy sond połączonych z wybranymi transkryptami mogły zostać wyizolowane dzięki użyciu kulek magnetycznych opłaszczonych streptawidyną. Schematyczny przebieg eksperymentu przedstawiono na rycinie numer 29.



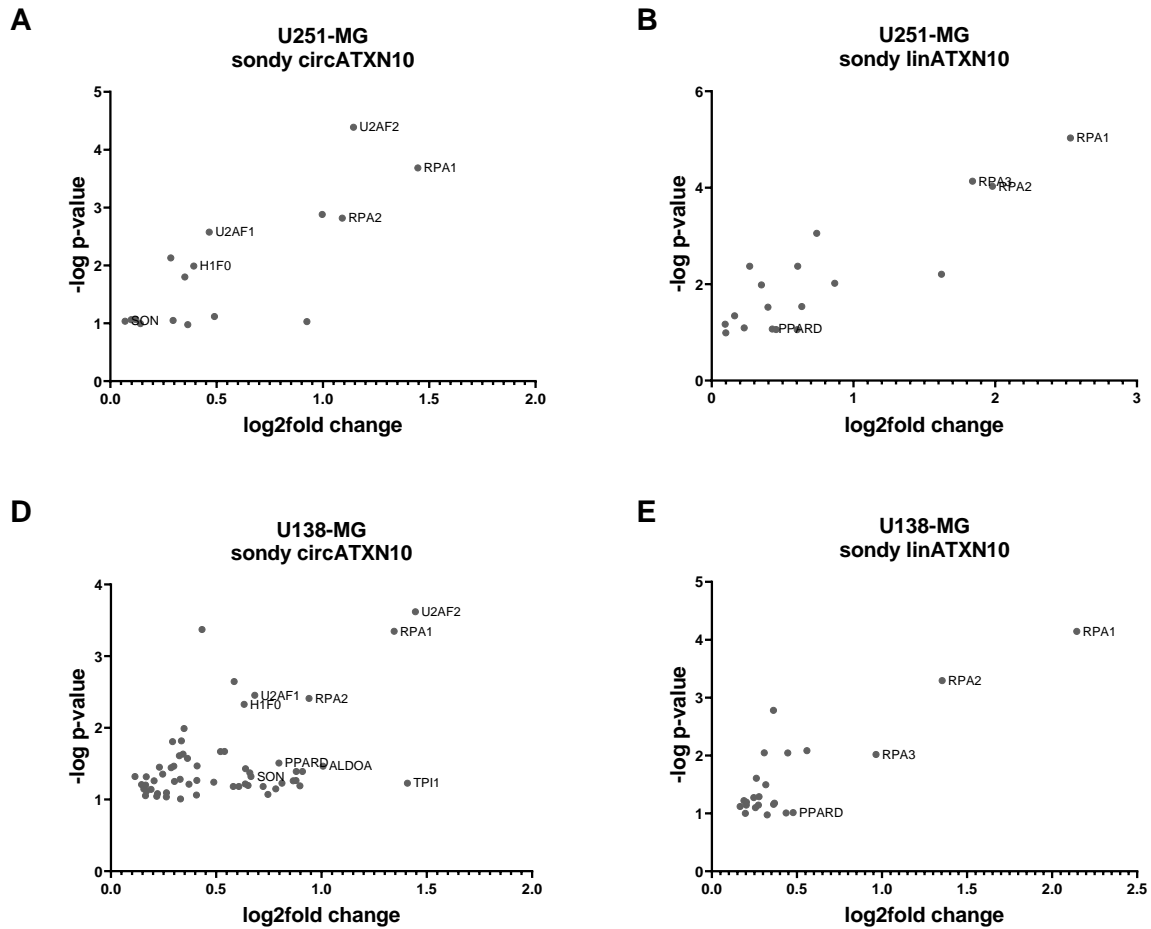
Rycina 29. Schematyczny przebieg eksperymentu typu „pulldown”.

Uzyskane wyniki potwierdziły poprawność wykonania eksperymentu – zaobserwowano wzbogacenie badanych próbek w transkrypt kolisty (o 6,6 % i 7,9 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG) i transkrypt liniowy (o 1,39 % i 1,78 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG). W celu weryfikacji specyficzności zastosowanych sond określono poziom circFAM188A oraz HPRT w badanych próbkach, w przypadku których nie zaobserwowano wzbogacenia. Otrzymane wyniki wskazały także, że zarówno w badanych próbkach z sondami circATXN10 obecna jest forma liniowa ATXN10 (wzbogacenie o 0,18 % i 0,16 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG) jak i w próbkach z sondami linATXN10 obecna jest forma kolista ATXN10 (wzbogacenie o 0,21 % i 0,69 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG). Potwierdziło to pośrednią lub bezpośrednią interakcję obu tych transkryptów, co wpływać może na wzajemną regulację ich ekspresji (Ryc. 30).



Rycina 30. Identyfikacja interakcji między transkryptami ATXN10 za pomocą eksperymentu typu „pulldown”. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD i obliczono na podstawie porównania ilości względnej transkryptów w próbkach badanych i ilości względnej transkryptów w próbce „input”. **A-B.** Eksperyment typu „pulldown” przeprowadzono w komórkach U138-MG z wykorzystaniem sond specyficznych dla circATXN10 (A) oraz sond specyficznych dla linATXN10 (B). **C-D.** Eksperyment typu „pulldown” przeprowadzono w komórkach U251-MG z wykorzystaniem sond specyficznych dla circATXN10 (C) oraz sond specyficznych dla linATXN10 (D). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do próbek kontrolnych, w przypadku których użyto sond LacZ. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

Przeprowadzony eksperyment typu „pulldown” umożliwił ekstrakcję kompleksów składających się z liniowych i kolistych transkryptów wraz z przyłączonymi do nich cząsteczkami. W celu identyfikacji białek, które mogłyby wchodzić w interakcję z wybranymi transkryptami i związane być z ich funkcjonowaniem, wykonano analizę spektrometrii mas badanych próbek circATXN10 oraz linATXN10. Optymalizacja metody elucji białek z kompleksów transkryptów ATXN10 przyłączonych do kulek magnetycznych umożliwiła przeprowadzenie analizy MS otrzymanych frakcji, a zidentyfikowane białka zostały przedstawione na rycinie numer 31 oraz w tabeli numer 24. W przypadku białek związanych z formą kolistą zaobserwowano wzbogacenie w białka z rodziny RPA oraz U2AF zarówno w linii U251-MG jak i U138-MG. W badanych próbkach z sondami komplementarnymi do formy liniowej odnotowano natomiast zwiększony poziom białek z rodziny RPA1 i PPARD.



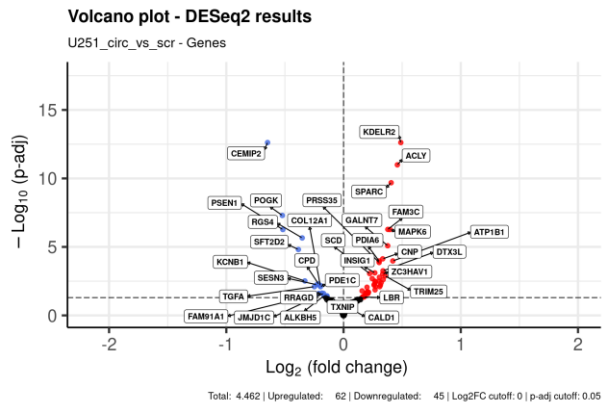
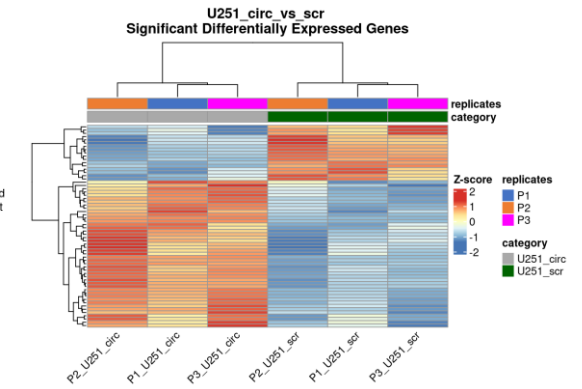
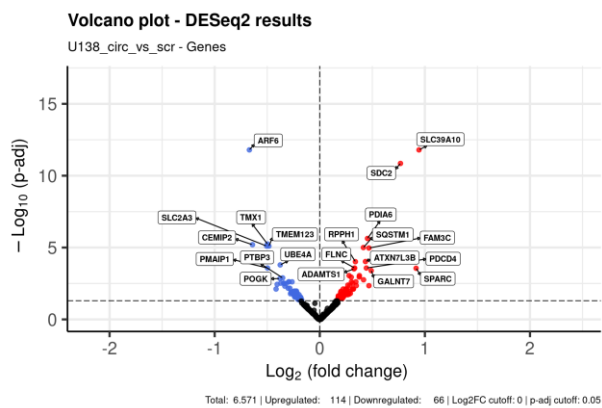
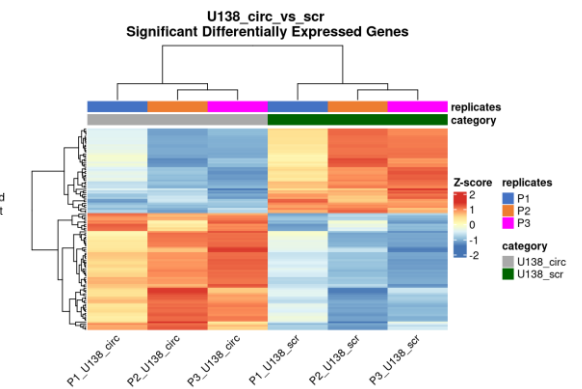
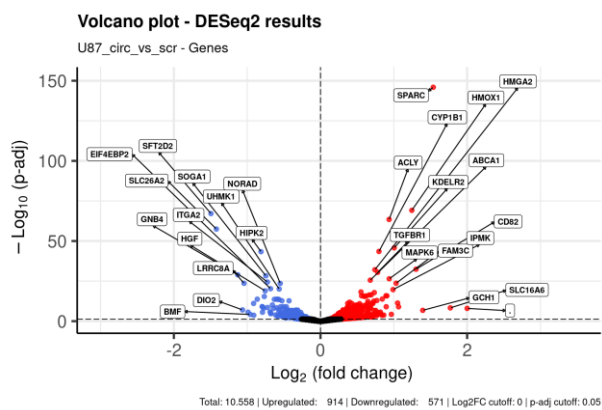
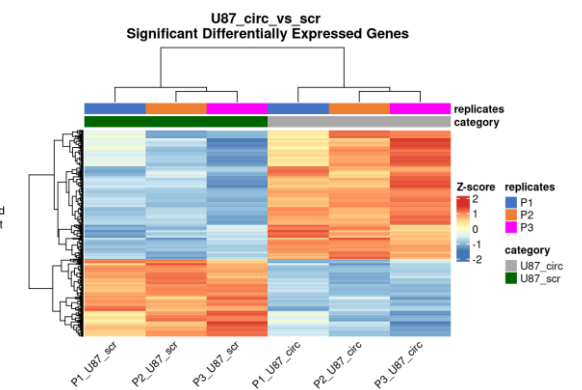
Rycina 31. Identyfikacja białek wchodzących w interakcję z transkryptami ATXN10 za pomocą spektrometrii mas (MS). A-B. Analizę MS przeprowadzono na podstawie próbek po eksperymencie typu „pulldown” w komórkach U251-MG z wykorzystaniem sond specyficznych dla circATXN10 (A) oraz sond specyficznych dla linATXN10 (B). C-D Analizę MS przeprowadzono na podstawie próbek po eksperymencie typu „pulldown” w komórkach U138-MG z wykorzystaniem sond specyficznych dla circATXN10 (C) oraz sond specyficznych dla linATXN10 (D). Wyniki porównano do próbek kontrolnych, w przypadku których użyto sond LacZ i obliczono log₂fold change. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu T-studenta i przedstawiona została na osi y jako wartość -Log p-value.

Tabela 24. Białka wspólne dla obu linii GBM (U251-MG i U138-MG) zidentyfikowane po eksperymencie „pulldown” z użyciem sond dla kolistego i liniowego transkryptu ATXN10.

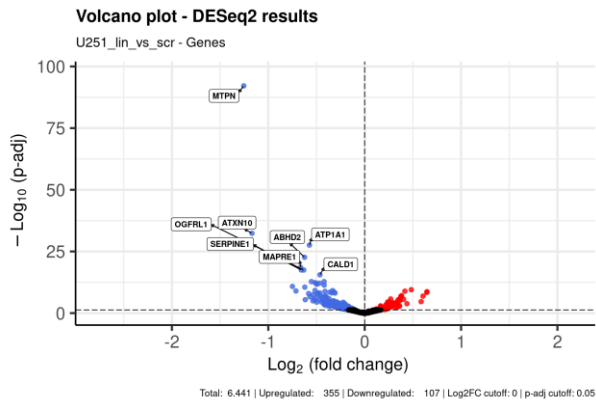
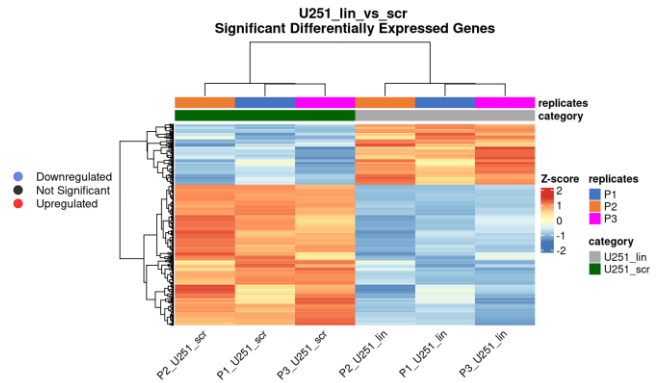
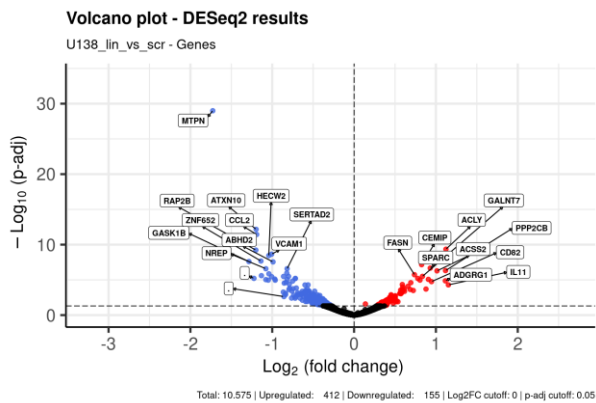
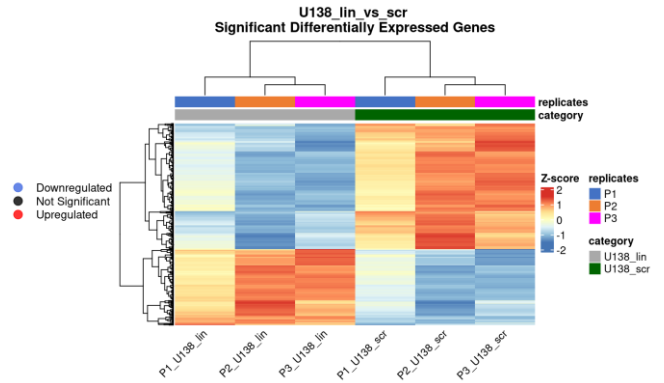
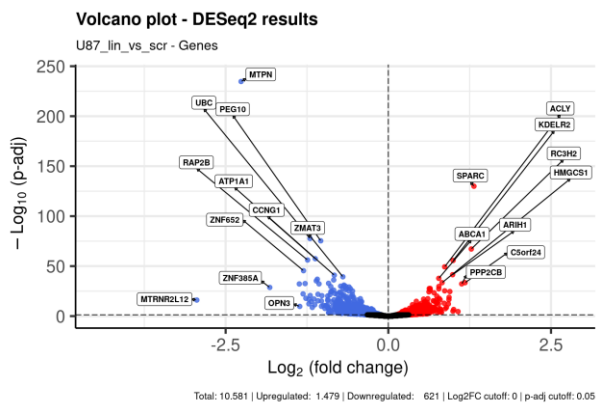
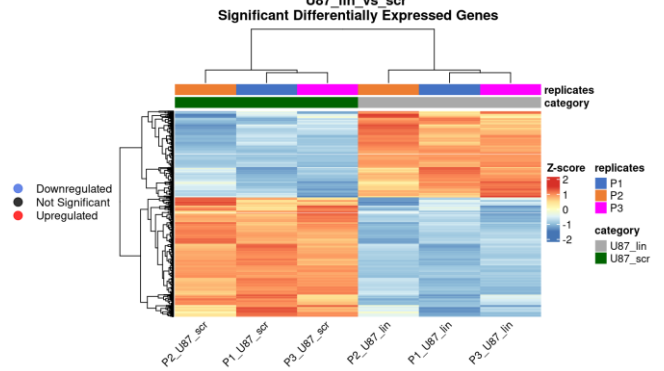
„Pulldown” transkryptu kolistego ATXN10					
Nazwa białka	Funkcja	U251-MG Log2FC	U251-MG - Log p-value	U138-MG Log2FC	U138-MG - Log p-value
U2AF2	Podjednostki kompleksu U2AF odpowiedzialnego za regulację splicingu	1,144	4,389	1,446	3,619
U2AF1		0,465	2,57	0,683	2,454
„Pulldown” transkryptu liniowego ATXN10					
Nazwa białka	Funkcja	U251-MG Log2FC	U251-MG - Log p-value	U138-MG Log2FC	U138-MG - Log p-value
RPA1	Biorą udział w replikacji, rekombinacji oraz naprawie DNA przez wiązanie się z jednoniciowym DNA	2,531	5,032	2,141	4,144
RPA2		1,981	4,029	1,353	3,294
RPA3		1,841	4,134	0,965	2,016
PPARD	Receptor jądrowy odpowiedzialny za regulację ekspresji genów związanych z metabolizmem komórkowym, proliferacją oraz przebiegiem stanów zapalnych.	0,4275	1,069	0,478	1,014

4.3.4. Określenie profilu ekspresji po obniżeniu poziomu kolistego i liniowego transkryptu ATXN10 za pomocą sekwencjonowania RNA

W celu określenia wpływu obniżenia poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 na profil ekspresji w komórkach GBM przeprowadzono sekwencjonowanie RNA próbek po wyciszeniu obu tych form za pomocą siRNA w stężeniu końcowym 50 nM. Różnicowa analiza ekspresji wykazała, iż obniżenie poziomu ekspresji kolistego transkryptu spowodowało deregulację ekspresji 107, 180 oraz 1485 genów odpowiednio w linii U251-MG (Log2FC między -0,65 i 0,49), U138-MG (Log2FC między -0,67 i 0,94), i U87-MG (Log2FC między -1,5 i 2) (Ryc. 32). W przypadku wyciszenia formy liniowej zaobserwowano zmianę poziomu ekspresji 462, 577 oraz 2100 genów odpowiednio w linii U251-MG (Log2FC pomiędzy -1,25 i 0,65), U138-MG (Log2FC pomiędzy -1,73 i 1,15), i U87-MG (Log2FC pomiędzy -2,94 i 1,32) (Ryc. 33). Obniżenie poziomu ekspresji formy liniowej spowodowało znaczne zwiększenie liczby genów o podniesionym poziomie ekspresji (odpowiednio 76 %, 72 % i 70 % transkryptów) w porównaniu do wyciszenia formy kolistej ATXN10 (odpowiednio 57 %, 63 %, 61 % transkryptów).

A**B****C****D****E****F**

Rycina 32. Analiza różnicowej ekspresji genów po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 komórkach U251-MG (A-B), U138-MG (C-D) oraz U87-MG (E-F). Każde wyciszenie zostało wykonane w 3 powtórzeniach biologicznych z użyciem specyficznego siRNA o stężeniu końcowym 50 nM. Niebieskie punkty wskazują na transkrypty o obniżonym poziomie ekspresji, a czerwone – transkrypty o podwyższonym poziomie ekspresji.

A**B****C****D****E****F**

Rycina 33. Analiza różnicowej ekspresji genów po obniżeniu poziomu ekspresji linATXN10 komórkach U251-MG (A-B), U138-MG (C-D) oraz U87-MG (E-F). Każde wyciszenie zostało wykonane w 3 powtórzeniach biologicznych z użyciem specyficznego siRNA o stężeniu końcowym 50 nM. Niebieskie punkty wskazują na transkrypty o obniżonym poziomie ekspresji, a czerwone – transkrypty o podwyższonym poziomie ekspresji.

Ze względu na dużą heterogenność linii komórkowych i różnice w otrzymanych wynikach analizy różnicowej ekspresji genów, zdecydowano się na identyfikację wspólnej grupy transkryptów dla wszystkich trzech linii komórkowych. Dlatego też wykonano analizę, w której wzięto pod uwagę jedynie te geny o zmienionym poziomie ekspresji, których deregulacja obecna była jednocześnie w linii U251-MG, U138-MG jak i U87-MG. W przypadku wyciszenia formy liniowej zidentyfikowano 77 takich genów, a przy wyciszeniu formy kolistej – 44. Wybrane z nich, wraz z opisem ich funkcji, przedstawiono w poniższej tabeli. Wśród genów o obniżonym poziomie ekspresji po wyciszeniu formy liniowej ATXN10 znalazło się mRNA kodujące białko RPA1 zidentyfikowane wcześniej jako potencjalny interaktor białkowy tego transkryptu. Ponadto odnotowano, iż największy efekt zmiany profilu ekspresji genów obserwuje się w przypadku linii U87-MG, co koresponduje z wcześniej otrzymanymi wynikami, w których najwyraźniejsze wzajemne zmiany poziomów ekspresji transkryptów ATXN10 zidentyfikowano właśnie w tej linii komórkowej.

Wszystkie wyniki udostępnione zostały pod adresem: https://drive.google.com/drive/folders/1h9IXZS_7lZcX9neGCRUxmkYb6cONUQAH?usp=drive_link oraz załączone w formie płyty CD do niniejszej rozprawy doktorskiej.

Tabela 25. Różnicowa analiza ekspresji wybranych genów wspólnych dla wszystkich trzech linii komórkowych. Wszystkie przedstawione wyniki posiadają adjusted p-value<0,01.

Wyciszenie linATXM10 – siRNA 50 nM				
		Linia komórkowa		
Nazwa	Opis	U251-MG Log2FC	U138-MG Log2FC	U87-MG Log2FC
GALNT7	Transferaza glikopeptydowa zaangażowana w inicjację O-glikozylacji	0,48	0,84	0,95
SPARC	Bogate w cysteinę białko związane z macierzą zewnątrzkomórkową. Odpowiada za regulację wzrostu komórek w kooperacji z ECM.	0,36	0,93	1,32
RPA1	Białko biorące udział w replikacji, rekombinacji oraz naprawie DNA przez wiązanie się z jednoniciowym DNA	-0,28	-0,80	-0,93
CDC14B	Fosfataza białkowa o podwójnej specyficzności zaangażowane w regulację odpowiedzi na uszkodzenie DNA, regulator punktu kontrolnego fazy G2	-0,50	-0,86	-0,50
VMA21	Chaperon odpowiedzialny za składanie lizosomalnej ATPazy	-0,51	-0,59	-0,34
CDK6	Kinaza białkowa serynowo-treoninowa zaangażowana w kontrolę cyklu komórkowego i różnicowanie; promuje przejście fazą G1/S.	-0,50	-0,72	-0,76
CCNG1	Cyklina regulująca wzrost komórki poprzez zatrzymanie fazy G2/M w odpowiedzi na uszkodzenie DNA.	-0,46	-0,55	-0,83
ADCY9	Cyklaza adenylowa zaangażowana w katalizowanie tworzenia cząsteczki sygnalizacyjnej cAMP w odpowiedzi na aktywację receptorów sprzężonych z białkiem G.	-0,54	-0,54	-1,03
LITAF	Odgrywa rolę w transporcie białek endosomalnych i ukierunkowaniu białek na degradację lizosomalną. Jest stymulatorem monocytów i makrofagów, indukując wydzielanie czynnika martwicy nowotworu alfa i innych mediatorów stanu zapalnego.	-0,62	-0,41	-1,14
Wyciszenie circATXM10 – siRNA 50 nM				
		Linia komórkowa		
Nazwa	Funkcja	U251-MG Log2FC	U138-MG Log2FC	U87-MG Log2FC
TGFBR1	Receptor transformującego czynnika wzrostu beta biorący udział w regulacji różnicowania komórek, cykl komórkowy oraz procesy związane z inwazją.	0,16	0,34	0,78
MAPK6	Kinaza aktywowana mitogenami odpowiedzialna za regulację cyklu komórkowego	0,40	0,38	0,94
POGK	Białko zawierające domenę KRAB o nieznaną dotąd funkcję.	-0,52	-0,38	-0,56

4.4. Charakterystyka circFAM188A

4.4.1. Identyfikacja miRNA posiadających miejsca wiązania z circFAM188A

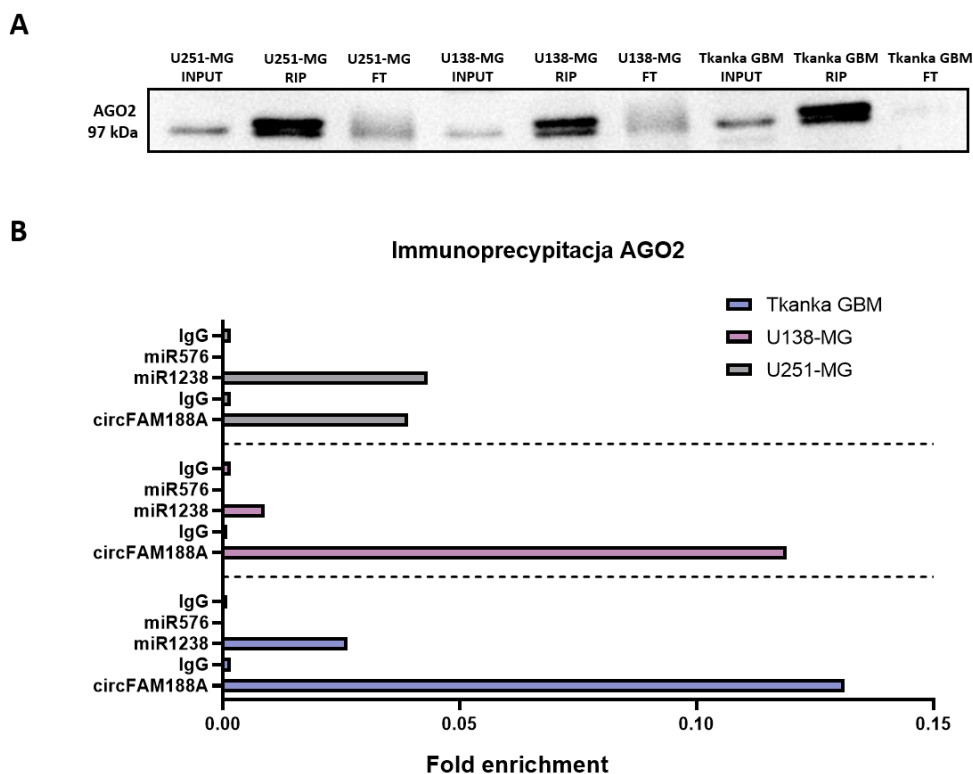
Doniesienia literaturowe wskazują, że główną rolą circRNA w procesach związanych z nowotworzeniem jest wiązanie miRNA, co modyfikuje biodostępność tych cząsteczek i może prowadzić do zwiększonego poziomu ekspresji transkryptów, które w fizjologicznych warunkach byłyby przez nie degradowane [261]. Korzystając z danych z bazy CircInteractome przeprowadzono analizę potencjalnych miejsc wiązania circFAM188 i zidentyfikowano dwa miRNA, które posiadały po dwa miejsca wiązania z tym kolistym transkryptem – miR-1238 oraz miR-576 (Ryc. 34).

TargetScan miRNA predictions												
CircRNA Mirbase ID	CircRNA (Top) - miRNA (Bottom) pairing	Site Type	CircRNA Start	CircRNA End	3' pairing	local AU	position	TA	SPS	context+ score	context+ score percentile	
hsa_circ_0000220 (5' ... 3')	UGGUUUC AUGGUUAAGAGGAAAG 	7mer-1a	241	247	0.001	0.001	-0.024	0.009	-0.017	-0.104	86	
hsa-miR-1238 (3' ... 5')	CCCCGUCUGUCUGCCUUC											
hsa_circ_0000220 (5' ... 3')	AGAGGAAGACAAACUGAGGAAAC 	7mer-1a	255	261	-0.013	0.019	-0.022	0.009	-0.017	-0.098	84	
hsa-miR-1238 (3' ... 5')	CCCCGUCUGUCUGCCUUC											
hsa_circ_0000220 (5' ... 3')	ACCUUGUGUAUUUUUAGAAG 	7mer-1a	186	192	-0.006	0.002	-0.030	0.027	0.070	-0.011	89	
hsa-miR-576-5p (3' ... 5')	UUUCUGCACCUCUU-AAUCUUA											
hsa_circ_0000220 (5' ... 3')	AUCAGAGGGAUCUGCAUUAGAAC 	7mer-m8	32	38	-0.007	0.048	-0.057	0.027	0.095	-0.014	90	
hsa-miR-576-5p (3' ... 5')	UUUCUGCACCUCUUAAUCUUA											

Rycina 34. Analiza miejsc wiązania circFAM188A i microRNA. Tabela wskazuje na potencjalne miejsca i typy wiązań circFAM188A z miR-1238 oraz z miR-576. Dane uzyskane zostały na podstawie bazy CircInteractome [120].

4.4.1.1. Potwierdzenie wiązania cząsteczek miRNA przez circFAM188A za pomocą immunoprecypitacji białka AGO2

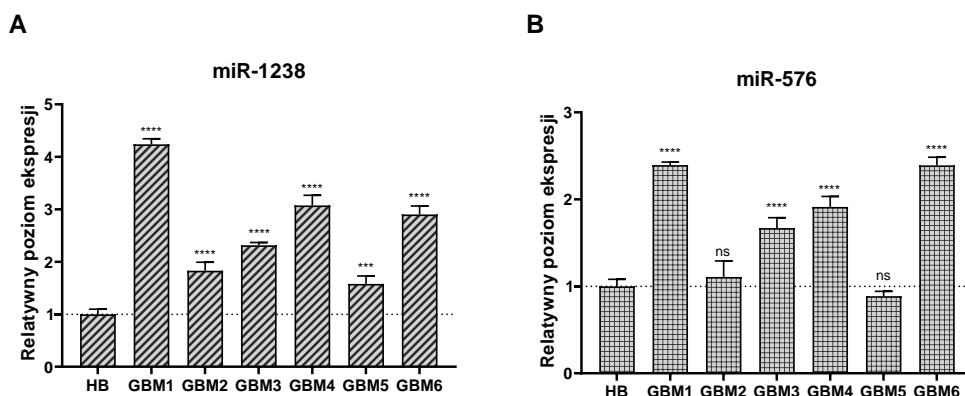
W celu potwierdzenia potencjalnej interakcji circFAM188A z miRNA przeprowadzono immunoprecypitację białka Ago2, które wchodzi w skład kompleksu RISC odpowiedzialnego za wiązanie miRNA i degradację docelowego mRNA w procesie interferencji RNA. Poprawność immunoprecypitacji potwierdzono za pomocą techniki western blot, z użyciem przeciwciała przeciwko AGO2, które potwierdziło obecność tego białka w badanych próbkach (Ryc. 35 A). Następnie zweryfikowano obecność circFAM188A oraz wybranych miRNA w wyizolowanych kompleksach i odnotowano wzbogacenie w próbkach po immunoprecypitacji – w przypadku circFAM188A było to 0,039; 0,19; i 0,13 odpowiednio w linii U251-MG, U138-MG oraz tkance GBM (Ryc. 35 B).



Rycina 35. Analiza potencjalnych interakcji między circFAM188A i miRNA za pomocą immunoprecytacji białka AGO2. Western blot potwierdzający poprawność wykonania immunoprecytacji przy użyciu przeciwciała AGO2 w tkance GBM oraz liniach komórkowych U138-MG i U251-MG (A). Obecność circFAM188A oraz miR-1238 we frakcji po immunoprecytacji AGO2. Wzbogacenie (fold enrichment) obliczone w porównaniu do frakcji kontrolnej z użyciem króliczego IgG (B).

4.4.1.2. Określenie poziomu miR-1238 i miR-576 w tkankach GBM

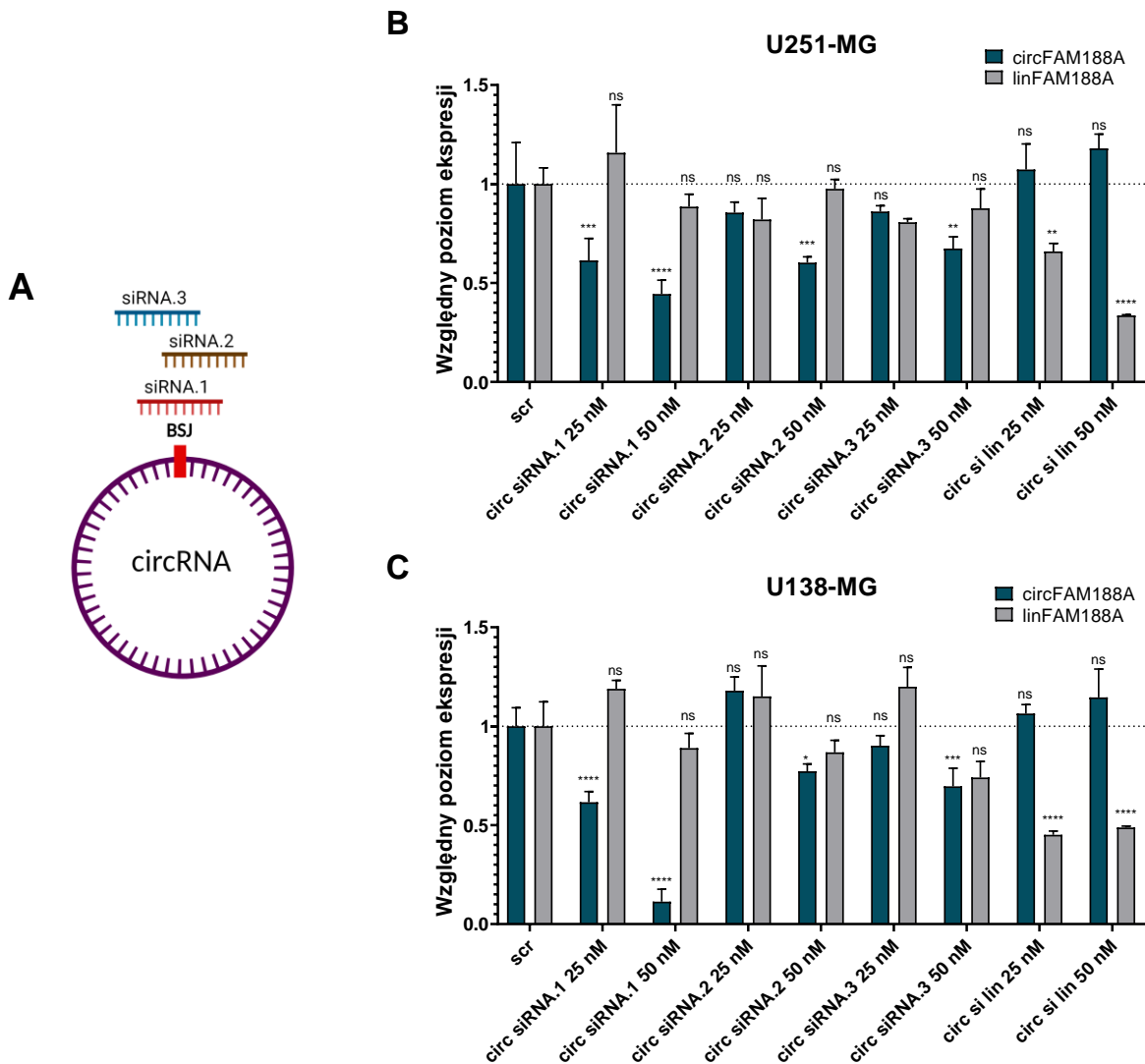
W kolejnym kroku określono poziom ekspresji miR-1238 oraz miR-576 w tkankach GBM. Przeprowadzona analiza wskazała, iż oba miRNA wykazują zwiększony poziom ekspresji w guzach w porównaniu do próbek kontrolnych zdrowego mózgu. W przypadku miR-1238 zaobserwowano średni wzrost ekspresji o 160 %, a w przypadku miR-576 średni wzrost o 72 % (Ryc. 36). Biorąc pod uwagę wysoką nadekspresję miR-1238 oraz jego udokumentowaną rolę w rozwoju chemiooporności komórek GBM, dalszym analizom poddano potencjalną interakcję circFAM188A i miR-1238 [262].



Rycina 36. Analiza poziomu miR-1238 (A) i miR-576 w guzach GBM. Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do kontroli jaką były próbki zdrowego mózgu (HB). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu One-Way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.4.1.3. Obniżenie poziomu ekspresji formy kolistej i liniowej FAM188A za pomocą siRNA

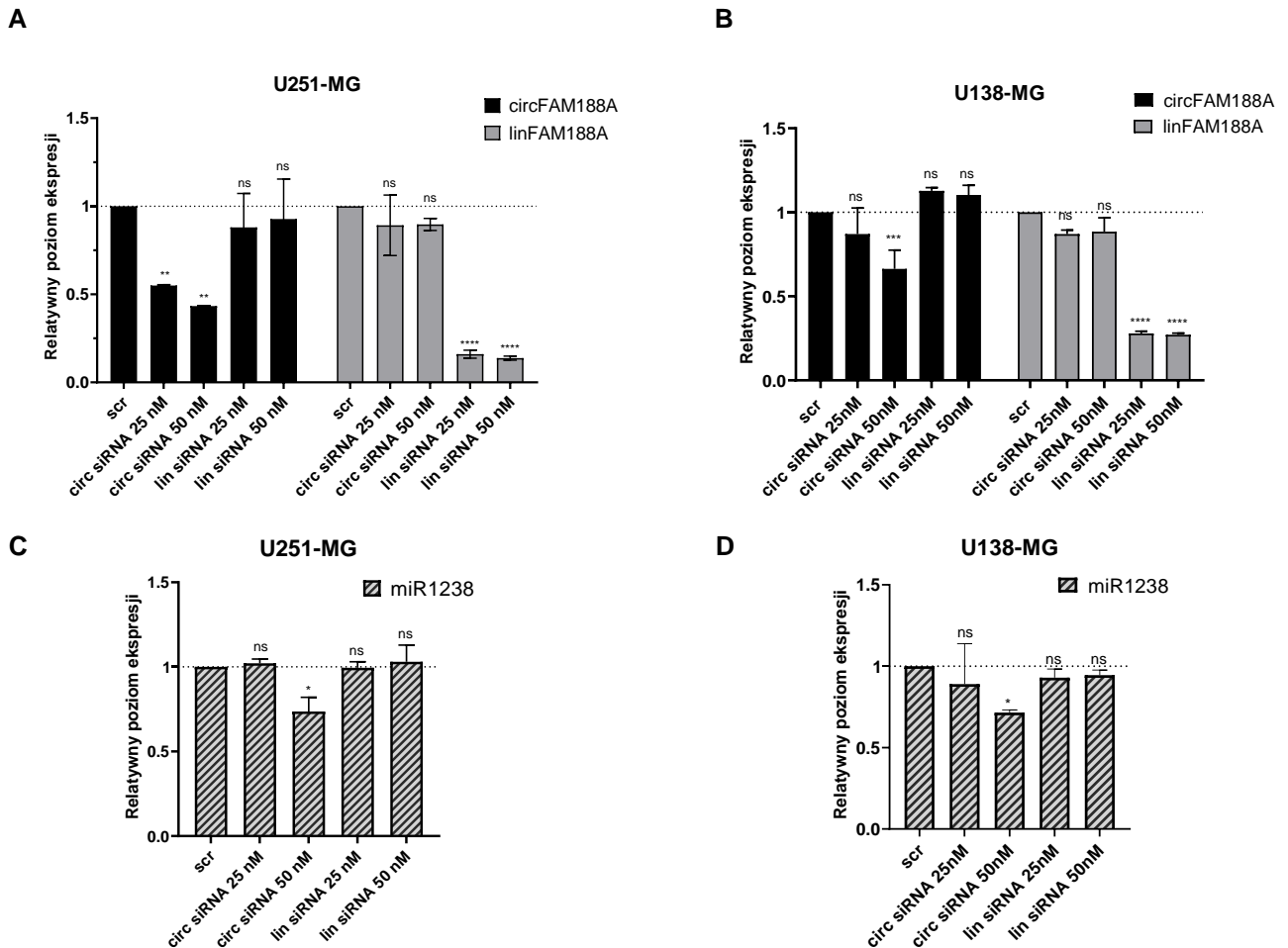
Aby określić relację między circFAM188A oraz miR-1238 wykorzystano podejście typu „utrata funkcji” i obniżono poziom ekspresji kolistej i liniowego transkryptu FAM188A za pomocą siRNA. W pierwszym kroku zaprojektowano oraz przetestowano 3 różne siRNA, których sekwencja była komplementarna do regionu BSJ w circFAM188A (Ryc. 37 A). W przypadku liniowej formy użyto gotowego siRNA komplementarnego do łączenia egzon-egzon w regionie, który nie wchodził w skład sekwencji circRNA, tak aby zastosowane obniżenie poziomu ekspresji było specyficzne dla każdego z transkryptów. Jako kontroli użyto niespecyficznego siRNA (scr, ang. *Scrambled*), który posiadał ten sam skład nukleotydowy co wybrane siRNA, ale inną sekwencję, która nie była komplementarna do żadnego znanego ludzkiego RNA. Przeprowadzona optymalizacja wskazała, iż najbardziej wydajny był siRNA.1, który skutecznie obniżył poziom ekspresji circFAM188 o ponad 50 %. Pozostałe siRNA (siRNA.2 i siRNA.3) w stężeniu końcowym 50 nM obniżyły ekspresję kolistej formy FAM188A jedynie o około 20-30 %, dlatego też w dalszych eksperymentach zastosowano siRNA.1 (Ryc. 37 B-C).



Rycina 37. Schemat projektowania siRNA (A) oraz analiza zmian poziomu ekspresji transkryptów FAM188A po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą różnych siRNA w liniach U251-MG (B) i U138-MG (C). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; * dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.**

Po optymalizacji przeprowadzono transfekcję komórek U251-MG oraz U138-MG wybranym siRNA o stężeniu końcowym 25 nM i 50 nM, a wyniki porównano do kontroli. Potwierdzono obniżenie poziomu zarówno kolistej jak i liniowej formy FAM188A. Ponadto wyciszenie żadnej z form transkrypcyjnych nie wpływało na poziom ekspresji drugiej (Ryc. 38 A-B). Po obniżeniu poziomu ekspresji circFAM188A (stężenie końcowe siRNA 50 nM) zaobserwowano, iż poziom ekspresji miR-1238 spada o średnio 27 % i 30 % odpowiednio w

linii U251-MG oraz U138-MG, natomiast nie zmienia się w przypadku obniżenia poziomu ekspresji linFAM188A (Ryc. 38 C-D). Otrzymane wyniki wskazały, iż poziom ekspresji miR-1238 zależy specyficznie od poziomu ekspresji transkryptu kolistego.

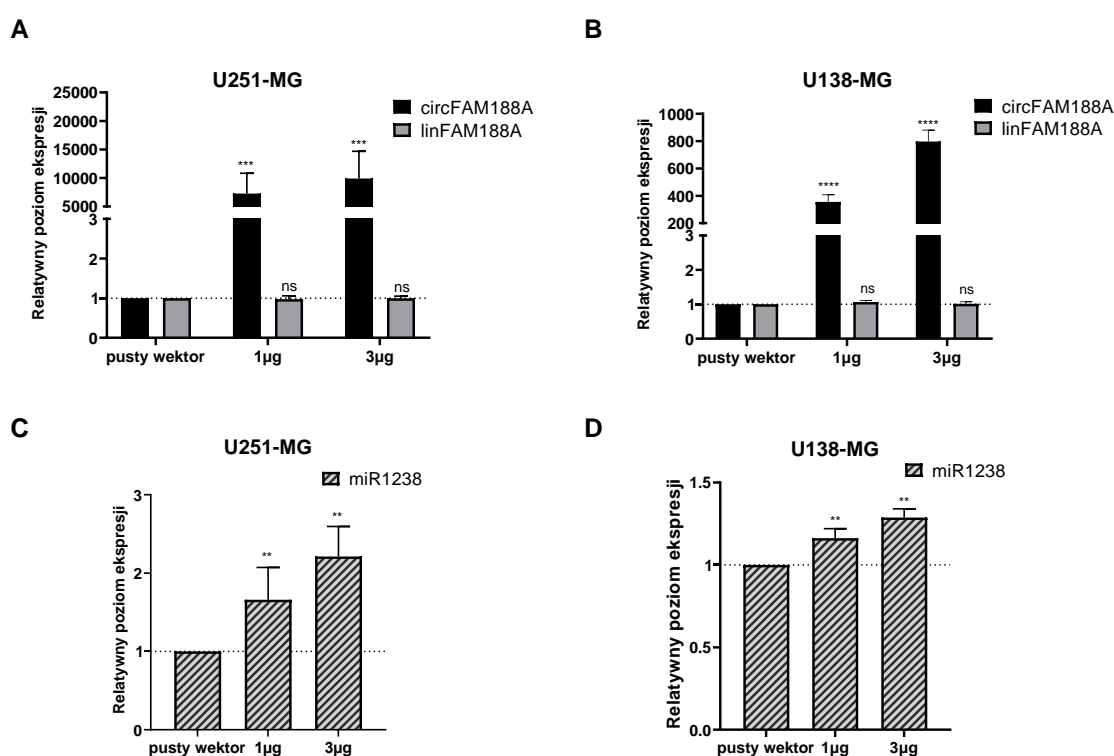


Rycina 38. Analiza zmian ekspresji transkryptów FAM188A i miR-1238 po obniżeniu poziomu ekspresji circFAM188A oraz linFAM188A za pomocą siRNA. Zmiany poziomu ekspresji transkryptów FAM188A w liniach U251-MG (A) oraz U138-MG (B). Zmiany poziomu ekspresji miR-1238 w liniach U251-MG (C) oraz U138-MG (D). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych siRNA kontrolnym (scr). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.4.1.4. Podwyższenie poziomu ekspresji kolistej formy FAM188A za pomocą wektora

Aby potwierdzić wcześniej zaobserwowaną zależność pomiędzy poziomem ekspresji circFAM188A, a miR-1238 wykonano dodatkowy eksperyment wykorzystując podejście typu „nabycie funkcji” ze wspomnianym w rozdziale 4.3.2 wektorem ekspresyjnym zawierającym

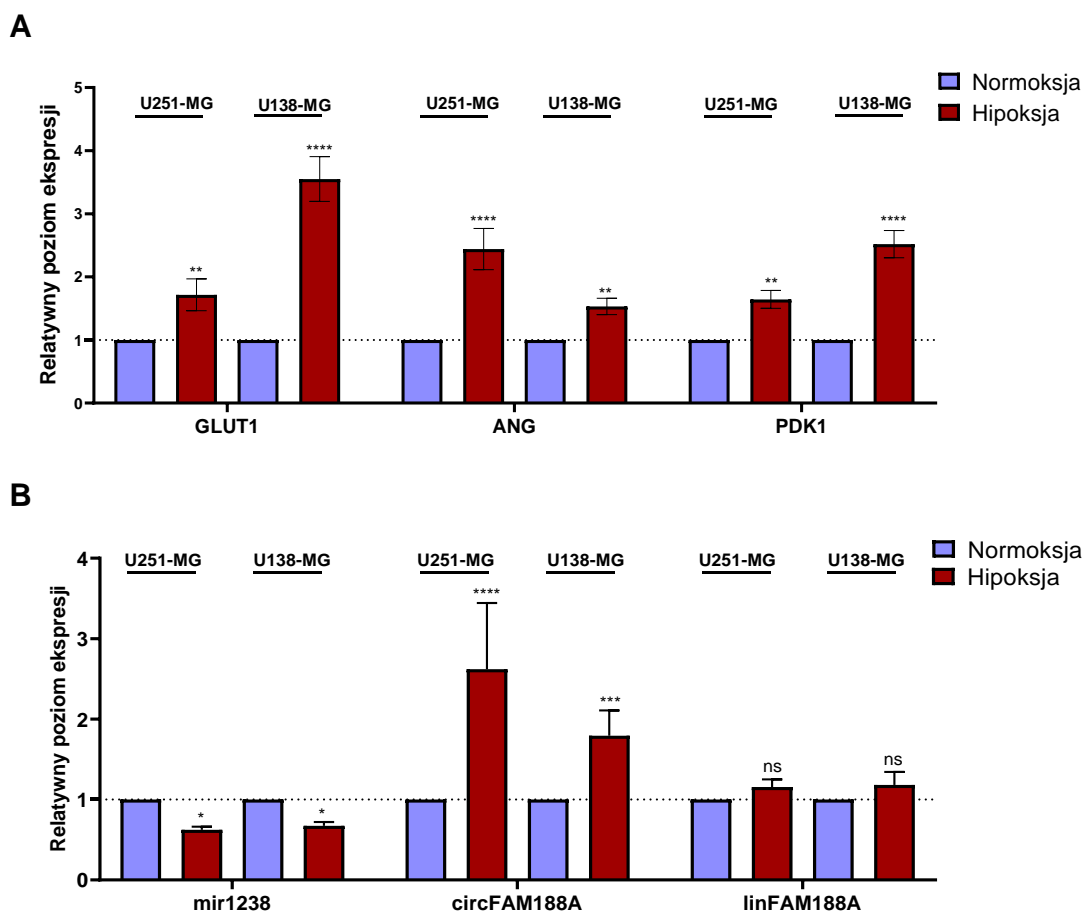
sekwencje Alu. Po transfekcji komórek sprawdzono poziom ekspresji transkryptów FAM188A i potwierdzono zwiększenie poziomu ekspresji formy kolistej, które wynosiło średnio 991100 % i 79600 % odpowiednio w linii U251-MG oraz U138-MG, podczas gdy poziom ekspresji formy liniowej nie ulegał zmianie (Ryc. 39 A-B). Następnie określono poziom ekspresji miR-1238 i odnotowano jego podwyższenie średnio o 20 % i 120 % odpowiednio w linii U251-MG i U138-MG (Ryc. 39 C-D). Otrzymane wyniki potwierdziły, iż wyciszenie circFAM188A w komórkach GBM zmniejsza poziom ekspresji miR-1238, natomiast zwiększenie poziomu ekspresji circFAM188A powoduje wzrost poziomu ekspresji miR-1238.



Rycina 39. Analiza zmian ekspresji transkryptów FAM188A i miR-1238 po podwyższeniu poziomu ekspresji circFAM188A za pomocą wektora. Zmiany poziomu ekspresji transkryptów FAM188A w liniach U251-MG (A) oraz U138-MG (B). Zmiany poziomu ekspresji miR-1238 w liniach U251-MG (C) oraz U138-MG (D). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT oraz r18S i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych traktowanych pustym wektorem. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.4.1.5. Wpływ środowiska hipoksyjnego na poziom ekspresji circFAM188A i miR-1238

Rozwój chemiooporności komórek GBM jest ściśle związany z hipoksją, ponieważ warunki niedoboru tlenu propagują rozwój komórek macierzystych glejaka oraz indukują szlaki związane z przejściowym stanem spoczynku (ang. *Cell quiescence*) [263,264]. Jak wspomniano wcześniej, doniesienia literaturowe wskazują na rolę miR-1238 w rozwoju chemiooporności, dlatego też zbadano wpływ niedoboru tlenu na poziom ekspresji circFAM188A i miR-1238. Po 5 dniach hodowli komórek w warunkach zmniejszonej dostępności tlenu (1 %) określono poziom ekspresji markerów hipoksji takich jak GLUT1, ANG oraz PDK1 (Ryc. 40 A). Następnie zaobserwowano, iż w komórkach poddanych hipoksji poziom miR-1238 spada o 38 % i 33 %, a circFAM188A wzrasta o 161 % i 79 % odpowiednio w linii U251-MG oraz U138-MG w porównaniu do komórek hodowanych w warunkach normoksji. Odnotowano jednocześnie, iż poziom liniowej formy FAM188A nie ulegał zmianie (Ryc. 40 B).

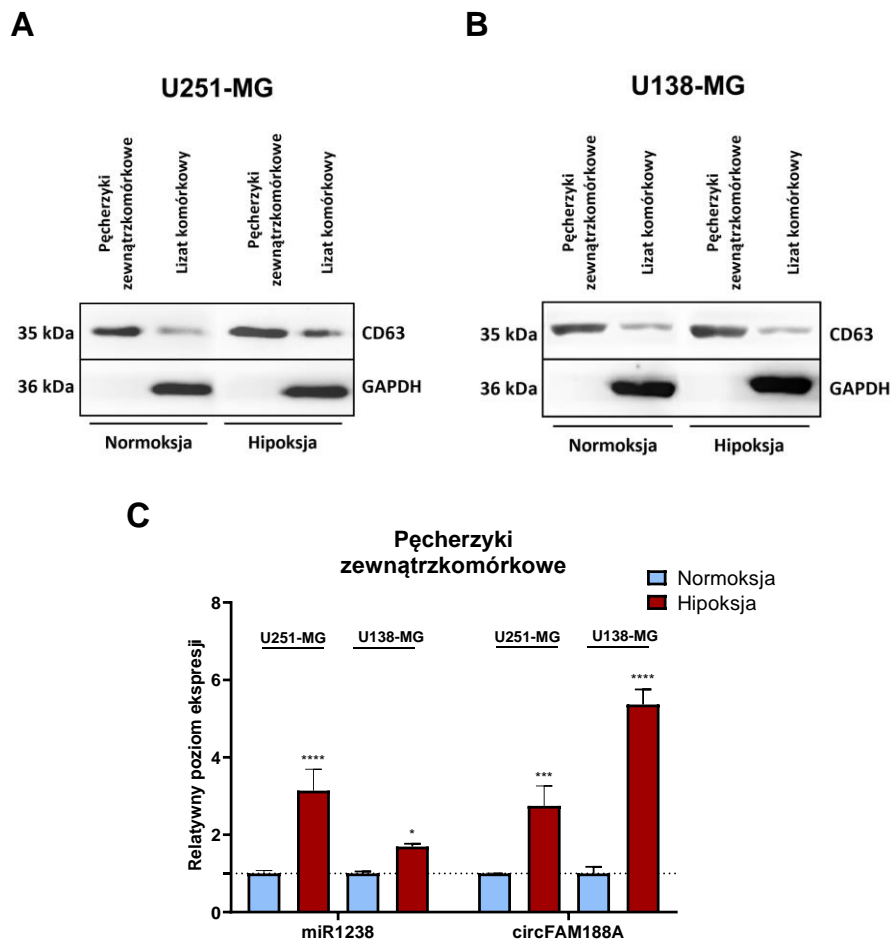


Rycina 40. Wpływ hipoksji na poziom ekspresji transkryptów FAM188A oraz miR-1238. Poziom ekspresji markerów hipoksji w komórka U251-MG oraz U138-MG (A). Zmiany poziomu ekspresji transkryptów FAM188A oraz miR-1238 w liniach U251-MG oraz U138-MG (B). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT oraz r18S i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych hodowanych w warunkach normoksji. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.4.1.6. Wpływ środowiska hipoksyjnego na poziom ekspresji circFAM188A i miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych

Doniesienia literaturowe wskazują, że miR-1238 znajduje się w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych, które ulegają sekrecji z komórek GBM i oddziałują w ten sposób na sąsiadujące tkanki [262]. W związku z tym, za pomocą gotowego zestawu, przeprowadzono izolację EV z pożywki komórek U251-MG oraz U138-MG hodowanych w normoksji oraz hipoksji, a poprawność izolacji potwierdzono za pomocą techniki western blot z użyciem przeciwciała specyficznego dla markera pęcherzyków zewnątrzkomórkowych jakim jest CD63 (Ryc. 41 A-B). W kolejnym kroku zbadano poziom miR-1238 oraz circFAM188A i

zaobserwowano, iż obie te cząsteczki posiadają zwiększony poziom ekspresji w EV izolowanych z komórek, które hodowane były w warunkach niedoboru tlenu. Wyniki te wskazały, iż poziom ekspresji obu tych cząsteczek zależy od hipoksji, która może jednocześnie wpływać na ich dystrybucję w komórkach i EV (Ryc. 41 C).

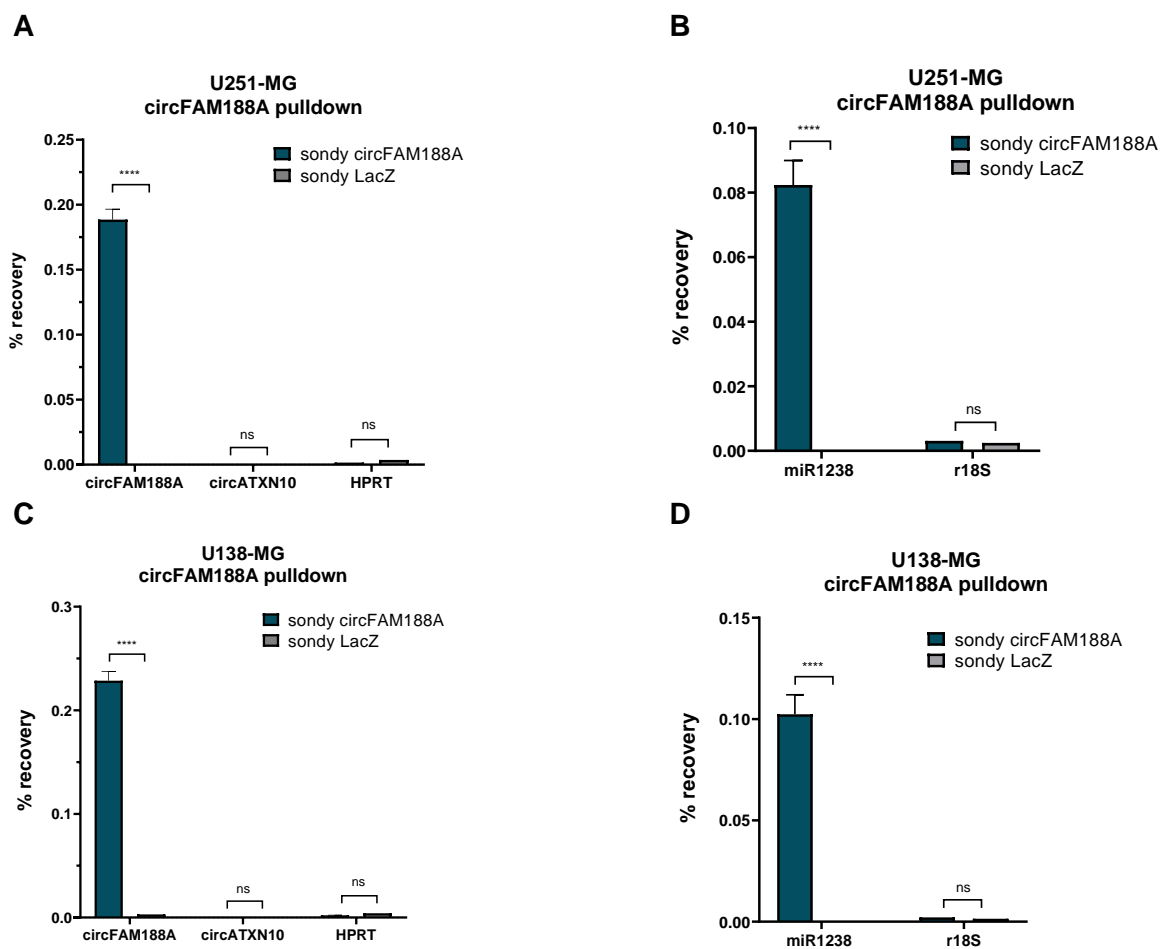


Rycina 41. Analiza wpływu hipoksji na poziom ekspresji transkryptów FAM188A oraz miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych. Identyfikacja CD63 będącego markerem pęcherzyków zewnątrzkomórkowych za pomocą techniki western blot w celu potwierdzenia poprawności wykonanej izolacji EV z medium komórek U251-MG (A) i U138-MG (B). Wyniki znormalizowano do poziomu białka GAPDH. Poziom ekspresji miR-1238 i circFAM188A w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych wyizolowanych z medium komórek U251-MG oraz U138-MG (C). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT oraz r18S i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do komórek kontrolnych hodowanych w warunkach normoksji. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.4.1.7. Identyfikacja interakcji circFAM188A i miR-1238 za pomocą eksperymentu typu „pulldown”

Otrzymane wyniki wskazały na potencjalną interakcję circFAM188A i miR-1238, a w celu jej potwierdzenia przeprowadzono eksperyment typu „pulldown”. W pierwszym kroku zaprojektowano sondy ASO znakowane biotyną na 3' końcu, które były komplementarne do sekwencji BSJ circAFAM188A, a do eksperymentu użyto mieszaniny czterech sond. Kompleksy ASO połączone z circFAM188A i jego potencjalnymi interaktorami mogły być następnie wyizolowane dzięki użyciu kulek magnetycznych opłaszczonych streptawidyną.

Uzyskane wyniki potwierdziły poprawność wykonania eksperymentu – zaobserwowano wzbogacenie badanych próbek z sondami komplementarnymi do circFAM188A (wzbogacenie o 0,18 % i 0,22 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG). W celu weryfikacji specyficzności zastosowanych sond zbadano poziom circATXN10 oraz HPRT w badanych próbkach, w przypadku których nie zaobserwowano wzbogacenia. Otrzymane wyniki wskazały, że w badanych próbkach circFAM188A obecny jest miR-1238 (wzbogacenie o 0,18 % i 0,16 % odpowiednio w linii U138-MG oraz U251-MG). Wyniki te potwierdziły potencjalną pośrednią lub bezpośrednią interakcję między tymi cząsteczkami (Ryc. 42).



Rycina 42. Identyfikacja interakcji między circFAM188 i miR-1238 za pomocą eksperymentu „pulldown”. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD i obliczono na podstawie porównania ilości względnej transkryptów w próbkach badanych i ilości względnej transkryptów w próbce „input”. Eksperyment „pulldown” przeprowadzono w komórkach U251-MG (A-B) oraz U138-Mg (C-D) z wykorzystaniem sond specyficznych dla circFAM188A. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w odniesieniu do próbek kontrolnych, w przypadku których użyto sond LacZ. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

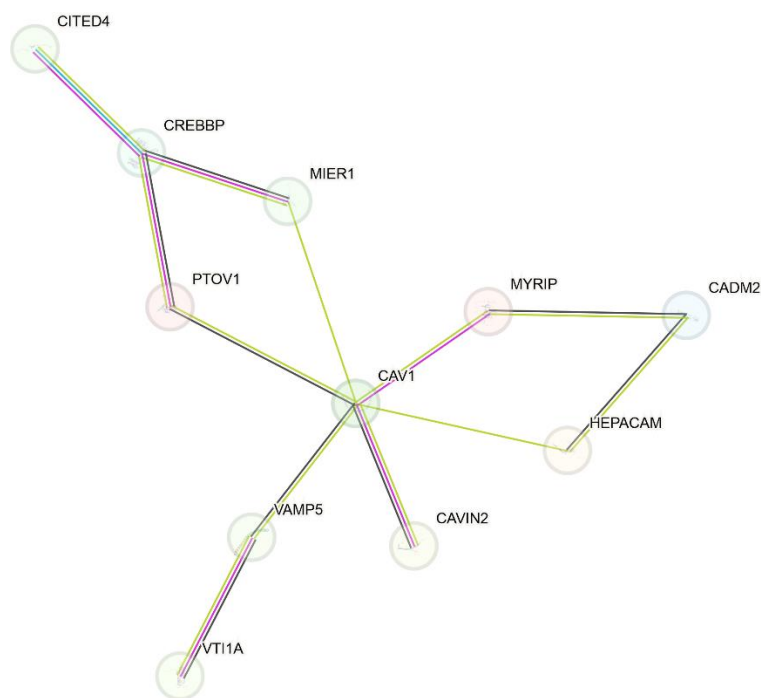
4.4.1.8. Określenie transkryptów z miejscami wiązania dla miR-1238

W następnym kroku, w celu zidentyfikowania miejsc wiązania miR-1238 w 3' UTR mRNA, przeprowadzono analizę *in silico* z użyciem dostępnych baz danych miRDB i TargetScan. Poniższa tabela podsumowuje wybrane transkrypty, w przypadku których miejsca wiązania potwierdzone zostały przez obie bazy.

Tabela 26. Wybrane transkrypty z miejscami wiązania dla miR-1238 potwierdzone za pomocą bazy miRDB i TargetScan.

Nazwa	Typ wiązania	Funkcja białka
MPST	2x 7mer-A1	Tranferaza biorąca udział w metabolizmie cysteiny, spełnia funkcje antyoksydacyjne.
CREBBP	3x 7mer-A1 1x 7mer-m8	Koaktywator transkrypcyjny odpowiedzialny za remodelowanie chromatyny.
CAV1	1x 7mer-m8 1x 6mer	Jeden z głównych składników mikrodomen błon komórkowych zwanych kaweolami. element związany ze szlakiem regulacji cyklu komórkowego – negatywny regulator kaskady kinaz aktywowanych mitogenami.
YTHDF2	2x 7mer-A1 1x 6mer	Białko wiążące RNA, odpowiedzialne za regulowanie ich stabilności – do degradacji kieruje RNA posiadające modyfikacje m6A.
HIGD1B	2x 7mer-A1	Element szlaku związanego z hipoksją obecny w błonie komórkowej.
CLDN14	1x 8mer	Składnik budujący połączenia ściśle między komórkami - odgrywa główną rolę w regulacji adhezji.
VTI1A	1x 8mer 1x 7mer-A1 3x 6mer	Pośredniczy w szlakach transportu pęcherzyków z endosomów do sieci aparatu Golgiego.
EMILIN1	1x 7mer-m8	Glikoproteina macierzy zewnątrzkomórkowej zaangażowana w regulację formacji włókien sprężystych.
CADM2	3x 7mer-A1	Cząsteczka adhezyjna biorąca udział w organizacji komórek oraz ich adhezji. Preferencyjnie wiąże się z oligodendrocytami.

Następnie, wykonano kolejną analizę *in silico* z użyciem bazy danych String, która umożliwia identyfikację znanych i przewidywanych interakcji między białkami. Do przeprowadzenia analizy, użyto wybranych białek, z których transkryptami może potencjalnie oddziaływać miR-1238 (Ryc. 43). Białka, które znalazły się w wygenerowanej sieci zaangażowane są w procesy biologiczne związane z adhezją i regulacją połączeń komórkowych, a także szlakami związanymi z hipoksją. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami dotyczącymi powiązania circFAM188A i miR1238 ze środowiskiem niedoboru tlenu.



Rycina 43. Schematyczna sieć powiązań białek, z których transkryptami może oddziaływać potencjalnie miR-1238. Znane, eksperymentalnie potwierdzone interakcje oznaczone są linią fioletową, interakcje przewidziane na podstawie sąsiedztwa genów – zieloną, a na podstawie homologii – niebieską.

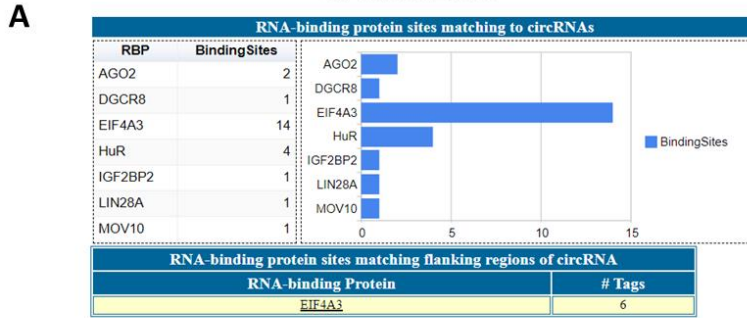
4.5. Określenie wpływu białek wiążących RNA na ekspresję wybranych kolistych RNA

4.5.1. Identyfikacja miejsc wiązania RBP i wybranych kolistych RNA

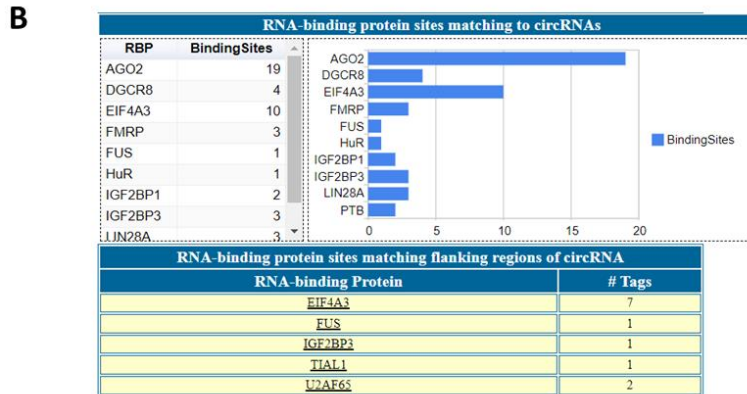
Wiele badań wskazuje na ważną rolę białek wiążących RNA w powstawaniu circRNA. W wielu przypadkach białka te decydują o biogenezie circRNA promując backsplicing poprzez wiązanie się z sekwencjami flankującymi oraz końcami 5' i 3' circRNA, co powoduje ich zbliżanie się do siebie i cyrkularyzację cząsteczki [265,266]. W celu określenia potencjalnego wpływu RBP na biogenezę wyselekcjonowanych wcześniej kolistych RNA – circATXN10 oraz circFAM188A, przeprowadzono analizę miejsc wiązania w regionach oskrzydających circRNA za pomocą danych dostępnych w bazie CircInteractome. Wykazały one, iż w regionach oskrzydających sekwencje circFAM188A znajduje się 6 miejsc wiązania dla białka EIF4A3, a w przypadku circATXN10 1 miejsce dla białka FUS oraz 7 miejsc wiązania dla białka EIF4A3. Oba te białka zostały już wcześniej zidentyfikowane jako RBP potencjalnie zaangażowane w biogenezę kolistych RNA (Ryc. 44) [126,227,235,267]. Ponadto określono miejsca wiązania wybranych circRNA z białkiem FUS i EIF4A3 na podstawie danych z bazy Encori, która zawiera zdeponowane wyniki pochodzące

z eksperymentów CLIP-seq. Ustalono, iż circFAM188A posiada 8 potwierdzonych eksperymentalnie miejsc wiązania z białkiem FUS i 5 miejsc wiązania z EIF4A3, natomiast circATXN10 ma odpowiednio 36 i 14 miejsc wiązania z obydwoma RBP [268].

circFAM188A



circATXN10



C

Circular RNA	Tag Name	% Identity	Alignment Length	Mismatches	Gap Openings	Tag Start	Tag End	Circular RNA Start	Circular RNA End
hsa_circ_0000220	HHLE2_150846_eIF4AIII_rep2_150846_14_88	98.86	88	1	0	1	88	137	224
hsa_circ_0000220	HHLE1_45253_eIF4AIII_rep1_45253_1_32	96.88	32	1	0	1	32	138	169
hsa_circ_0000220	HHLE1_45252_eIF4AIII_rep1_45252_1_37	100.00	37	0	0	1	37	172	208
hsa_circ_0000220	HHLE2_150845_eIF4AIII_rep2_150845_10_82	100.00	82	0	0	1	82	229	310
hsa_circ_0000220	HHLE1_45251_eIF4AIII_rep1_45251_5_66	100.00	65	0	0	1	65	251	315
hsa_circ_0000220	HHLE2_150838_eIF4AIII_rep2_150838_1_35	100.00	34	0	0	1	34	334	367
hsa_circ_0000220	HHLE1_45250_eIF4AIII_rep1_45250_4_51	100.00	51	0	0	1	51	368	418
hsa_circ_0000220	HHLE2_150835_eIF4AIII_rep2_150835_3_37	100.00	36	0	0	1	36	448	483
hsa_circ_0000220	HHLE1_45249_eIF4AIII_rep1_45249_3_35	100.00	34	0	0	1	34	450	483
hsa_circ_0000220	HHLE1_45246_eIF4AIII_rep1_45246_12_77	100.00	76	0	0	1	76	481	556
hsa_circ_0000220	HHLE2_150830_eIF4AIII_rep2_150830_15_83	100.00	82	0	0	1	82	555	636
hsa_circ_0000220	HHLE1_45245_eIF4AIII_rep1_45245_8_49	100.00	48	0	0	1	48	589	636
hsa_circ_0000220	HHLE1_45254_eIF4AIII_rep1_45254_5_57	100.00	56	0	0	1	56	86	141
hsa_circ_0000220	HHLE2_150852_eIF4AIII_rep2_150852_15_50	100.00	49	0	0	1	49	93	141

D

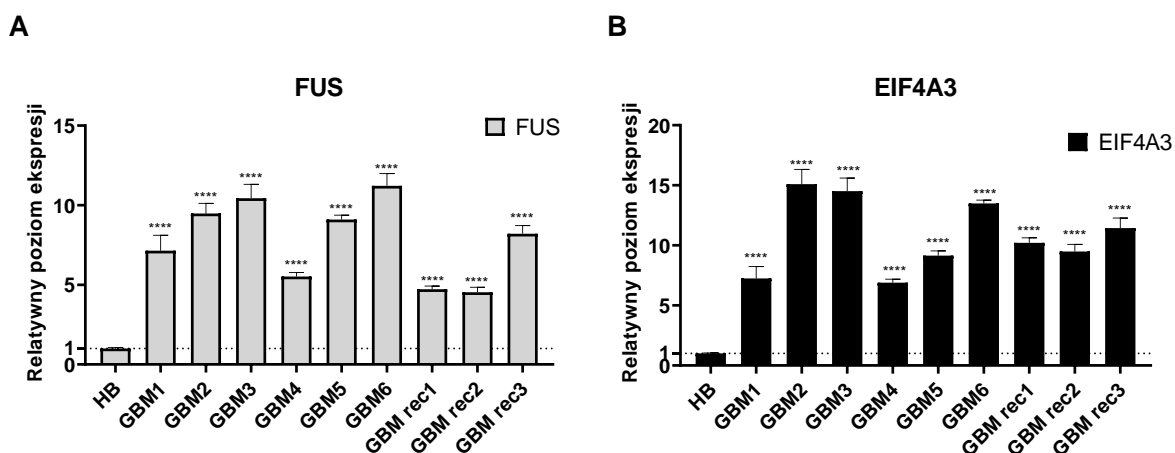
Circular RNA	Tag Name	% Identity	Alignment Length	Mismatches	Gap Openings	Tag Start	Tag End	Circular RNA Start	Circular RNA End
hsa_circ_0001246	HHMF2_243484_FUS_rep2_6_34	100.00	34	0	0	1	34	636	669

Circular RNA	Tag Name	% Identity	Alignment Length	Mismatches	Gap Openings	Tag Start	Tag End	Circular RNA Start	Circular RNA End
hsa_circ_0001246	HHLE1_231491_eIF4AIII_rep1_231491_11_78	100.00	78	0	0	1	78	168	245
hsa_circ_0001246	HHLE2_758670_eIF4AIII_rep2_758670_23_91	100.00	91	0	0	1	91	168	258
hsa_circ_0001246	HHLE2_758680_eIF4AIII_rep2_758680_9_82	100.00	81	0	0	2	82	257	337
hsa_circ_0001246	HHLE1_231493_eIF4AIII_rep1_231493_1_47	100.00	47	0	0	1	47	291	337
hsa_circ_0001246	HHLE1_231496_eIF4AIII_rep1_231496_13_108	100.00	107	0	0	2	108	336	442
hsa_circ_0001246	HHLE2_758687_eIF4AIII_rep2_758687_31_109	100.00	109	0	0	1	109	396	504
hsa_circ_0001246	HHLE1_231497_eIF4AIII_rep1_231497_19_61	100.00	61	0	0	1	61	444	504
hsa_circ_0001246	HHLE2_758691_eIF4AIII_rep2_758691_37_106	100.00	105	0	0	2	106	502	606
hsa_circ_0001246	HHLE1_231500_eIF4AIII_rep1_231500_31_112	100.00	111	0	0	2	112	502	612
hsa_circ_0001246	HHLE2_758669_eIF4AIII_rep2_758669_12_57	100.00	56	0	0	2	57	98	153

Rycina 44. Identyfikacja potencjalnych miejsc wiązania białek i wybranych circRNA. Miejsca wiązania białek i circFAM188A (A). Miejsca wiązania białek i circATXN10 (B). Długość sekwencji wiążącej białko EIF4A3 w circFAM188A (C) oraz białka EIF4A3 i FUS w circATXN10 (D) potwierdzone za pomocą eksperymentu CLIP-seq. Dane uzyskane na podstawie bazy CircInteractome [120].

4.5.2. Określenie poziomu ekspresji transkryptów FUS i EIF4A3 w guzach GBM

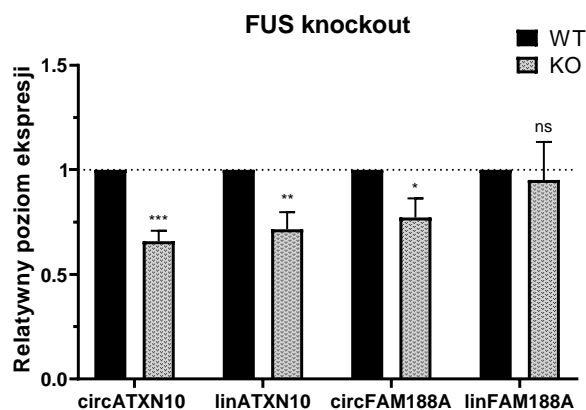
W następnym kroku określono poziom ekspresji transkryptów wybranych RBP w guzach GBM w porównaniu do kontroli, jaką stanowiły próbki zdrowego mózgu. Wyniki wskazały, iż zarówno FUS jak i EIF4A4 posiadają zwiększony poziom ekspresji, odpowiednio o 700 % i 1005 % w guzach pierwotnych oraz 580 % i 903 % w guzach wtórnych (Ryc. 45).



Rycina 45. Analiza poziomu ekspresji transkryptów FUS (A) oraz EIF4A3 (B) w guzach glejaka. Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – zdrowego mózgu (HB). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu One-Way ANOVA rozszerzonej testem Tukey'a.: ns – nieistotnie statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

4.5.3. Badanie poziomu ekspresji wybranych kolistych RNA w komórkach glejaka z delecją genu *fus*

Dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierownictwem Prof. Doroty Raczyńskiej, uzyskano dostęp do komórek, które pozbawione zostały ekspresji białka FUS za pomocą techniki CRISPR/Cas9 [269]. Poziom ekspresji wybranych circRNA sprawdzono w trzech różnych klonach i zaobserwowano, że w komórkach pozbawionych białka FUS w przypadku ATXN10 poziom ekspresji obu transkryptów spada (circATXN10 o 35 % i linATXN10 o 29 %), natomiast jeśli chodzi o FAM188A obniżoną ekspresją charakteryzowała się jedynie forma kolista (o 23 %), podczas gdy poziom ekspresji formy liniowej pozostawał bez zmian (Ryc. 46).

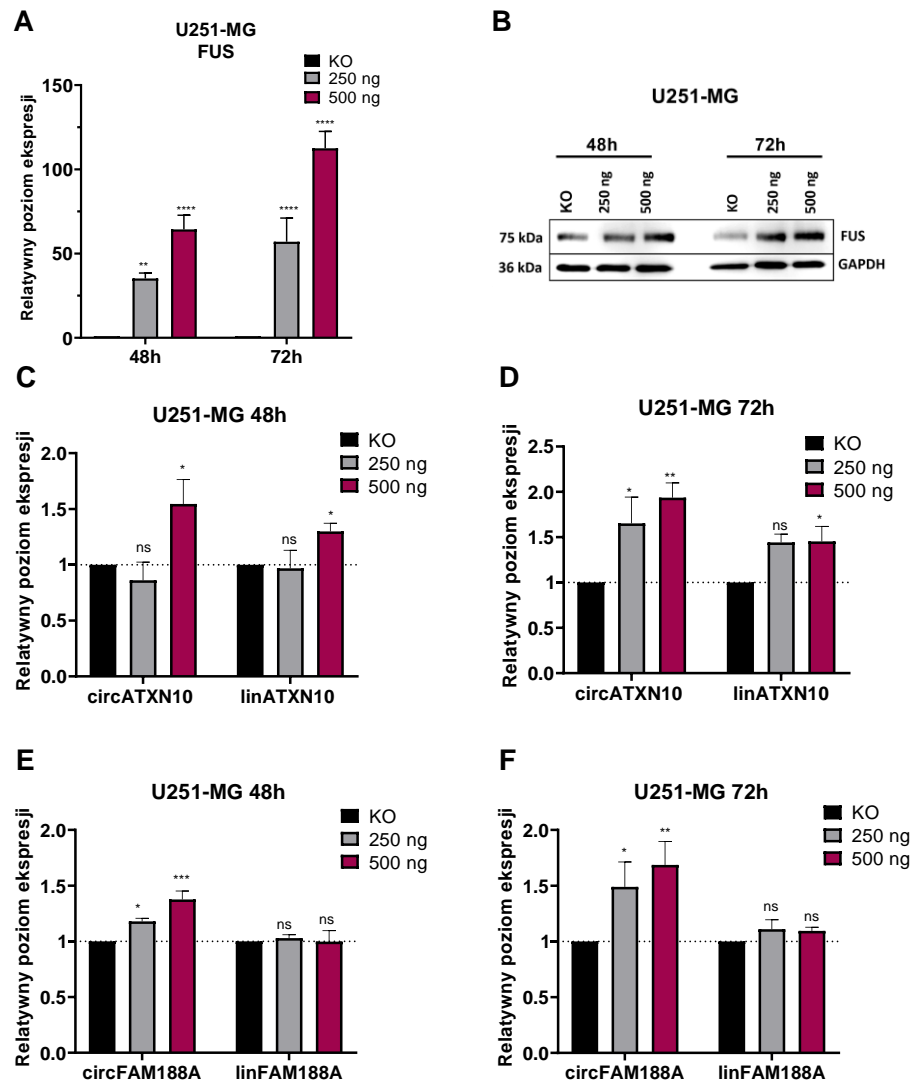


Rycina 46. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 i FAM188A w komórkach U87-MG z inaktywowanym genem *fus* (KO). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek typu dzikiego (WT). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

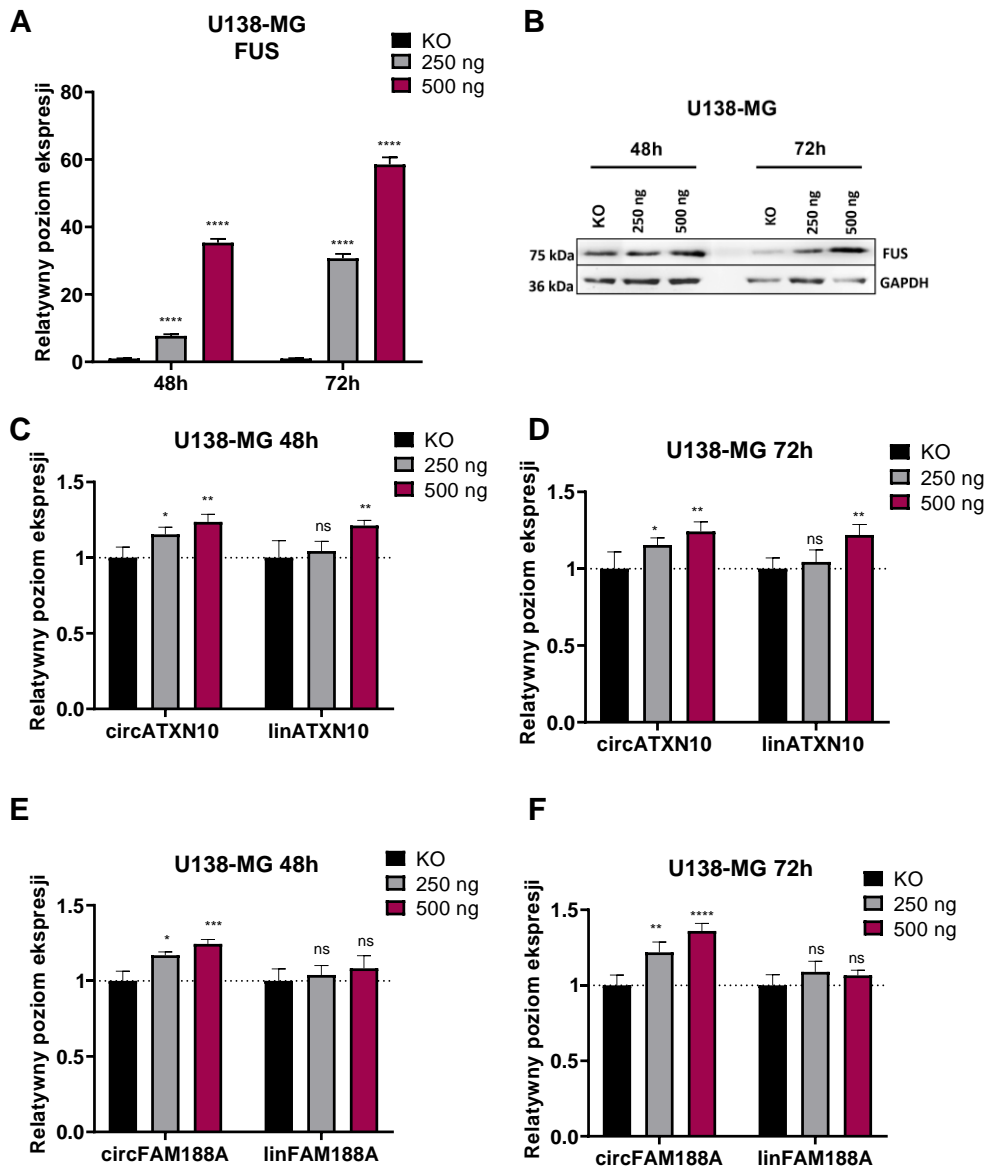
4.5.4. Poziom wybranych kolistych RNA w komórkach GBM ze zwiększonym poziomem białka FUS

Aby potwierdzić potencjalny wpływ białka FUS na poziom ekspresji wybranych circRNA przeprowadzono eksperyment z wykorzystaniem podejścia typu „nabycie funkcji” za pomocą wektora do nadekspresji tego białka. Wektor został uzyskany dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu pod kierownictwem Prof. Doroty Raczyńskiej. W pierwszym kroku sprawdzono poprawność transfekcji poprzez określenie poziomu ekspresji transkryptu FUS oraz białka FUS w liniach U251-MG (Ryc. 47 A-B), U138-MG (Ryc. 48 A-B) oraz U87-MG (Ryc. 49 A-B). W każdej z linii udało się potwierdzić zwiększony poziom ekspresji zarówno transkryptu jak i białka FUS, tak więc w następnym kroku zbadano poziom ekspresji wybranych circRNA. Zaobserwowano, iż poziom ekspresji transkryptów ATXN10 we wszystkich liniach traktowanych wektorem o stężeniu 500 ng po 72h po transfekcji jest zwiększony – circATXN10 o 93 %, 24 % i 35 % odpowiednio w liniach U251-MG, U138-MG oraz U87-MG, a linATXN10 o 45 %, 21 % i 23 % odpowiednio w liniach U251-MG, U138-MG oraz U87-MG. W przypadku FAM188A odnotowano jedynie podwyższenie poziomu ekspresji kolistego transkryptu o 60 %, 35 % i 34 % odpowiednio w liniach U251-MG, U138-MG oraz U87-MG podczas gdy poziom ekspresji formy liniowej pozostawał bez zmian (Ryc. 47-49 C-F). Otrzymane wyniki wskazały na potencjalny wpływ białka FUS na poziom ekspresji

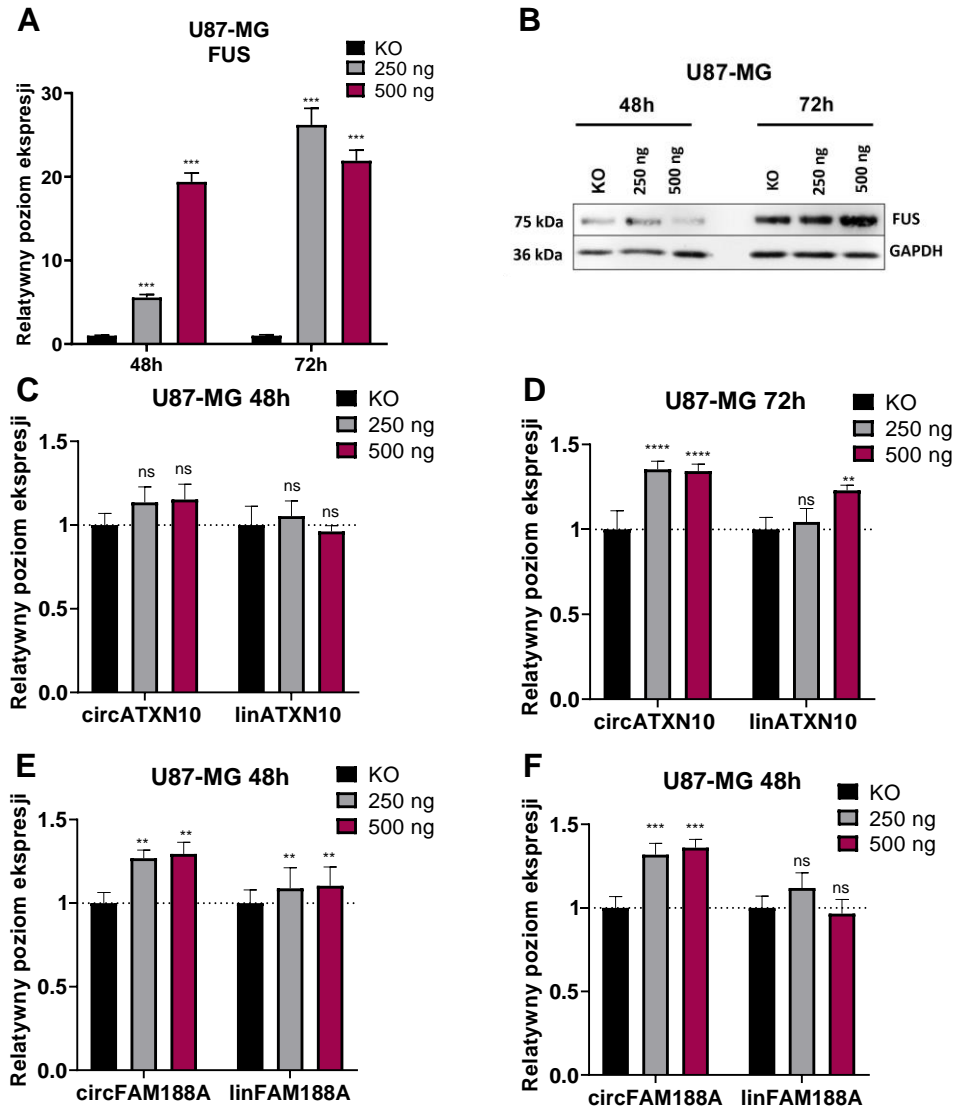
wybranych circRNA. Ponadto zaobserwowano, iż w przypadku ATXN10 podwyższonej ekspresji ulegają oba transkrypty, co dodatkowo potwierdziło zależność między biogenezą formy liniowej i kolistej.



Rycina 47. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 i FAM188A w komórkach U251-MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. Poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem (A). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Poziom białka po transfekcji wektorem – wyniki znormalizowano do poziomu białka GAPDH (B). Poziom ekspresji transkryptów ATXN10 po transfekcji wektorem (C-D). Poziom ekspresji transkryptów FAM188A po transfekcji wektorem (E-F). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroni.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.



Rycina 48. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 i FAM188A w komórkach U138-MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. Poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem (A). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Poziom białka po transfekcji wektorem – wyniki znormalizowano do poziomu białka GAPDH (B). Poziom ekspresji transkryptów ATXN10 po transfekcji wektorem (C-D). Poziom ekspresji transkryptów FAM188A po transfekcji wektorem (E-F). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroniego.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.



Rycina 49. Analiza poziomu ekspresji transkryptów ATXN10 i FAM188A w komórkach U87-MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. Poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem (A). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Poziom białka po transfekcji wektorem – wyniki znormalizowano do poziomu białka GAPDH (B). Poziom ekspresji transkryptów ATXN10 po transfekcji wektorem (C-D). Poziom ekspresji transkryptów FAM188A po transfekcji wektorem (E-D). Wyniki znormalizowano do poziomu ekspresji HPRT i przedstawiono jako średnie wartości \pm SD w porównaniu do próbki kontrolnej – komórek traktowanych pustym wektorem (KO). Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA rozszerzonej testem Bonferroni.: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$.

5. Dyskusja

Guzy centralnego układu nerwowego stanowią niezwykle groźną grupę nowotworów ze względu na swoją lokalizację i ograniczone możliwości terapeutyczne [270]. W tej grupie najbardziej agresywnym i najczęściej występującym typem nowotworu jest glejak wielopostaciowy, który charakteryzuje się znaczącą zdolnością do infiltracji sąsiadujących tkanek [271,272]. Mimo ogromnego postępu medycznego przeżywalność osób chorych na GBM nie zwiększa się, a dostępne terapie nie dostarczają oczekiwanych rezultatów. Dlatego też niezwykle istotne jest jeszcze lepsze poznanie i zrozumienie mechanizmów molekularnych odpowiadających za wysoką agresywność tego guza. W kontekście GBM istotne jest nie tylko poszukiwanie nowych celów terapeutycznych, ale także odkrywanie markerów diagnostycznych i tworzenie klasyfikacji molekularnych, które mogą ułatwić wybór skuteczniejszej ścieżki leczenia, a także dokładniej określić prognozy dotyczące odpowiedzi na terapię [273-275].

5.1. Profil ekspresji kolistych RNA w GBM

Niekodujące RNA stały się w ostatnim czasie obiecującym obszarem badawczym w kontekście mechanizmów odpowiedzialnych za procesy związane z rozwojem GBM. Wśród nich, ze względu na dużą stabilność oraz specyficzny i wysoki poziom ekspresji w mózgu, za niezwykle interesujące uważane są koliste RNA [276-278]. Do tej pory scharakteryzowano potencjalny wpływ kilkudziesięciu circRNA na rozwój i progresję guzów GBM. Nadal brakuje jednak informacji o globalnym profilu ekspresji kolistych RNA oraz ich roli w sieci powiązań z innymi cząsteczkami. Dotychczas przeprowadzono jedną szeroko zakrojoną analizę poziomów ekspresji circRNA w glejaku wielopostaciowym oraz glejakach o niskim stopniu złośliwości, nie brała ona jednak pod uwagę glejaków wtórnych [279].

W niniejszej pracy przedstawiono wyniki z sekwencjonowania RNA 26 próbek guzów GBM (23 guzy pierwotne i 3 guzy wtórne). Otrzymane wyniki umożliwiły identyfikację grupy nieznanych dotąd circRNA, co wyraźnie wskazuje na konieczność jeszcze dokładniejszego badania tych cząsteczek, których całkowita liczba nie została jeszcze określona. Przeprowadzona analiza profilu ekspresji circRNA oraz ich liniowych odpowiedników w guzach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu wskazała, iż większość circRNA charakteryzuje się obniżonym poziomem ekspresji. Obserwacja ta zgodna jest z badaniami circRNA w innych nowotworach takich jak rak krtani czy rak jelita grubego [221,280]. Zjawisko to tłumaczy się między innymi faktem wysokiego tempa proliferacji

komórek nowotworowych i nazwane zostało efektem „rozcieńczenia” (ang. „*dillution*”). Backsplicing jest bowiem procesem dużo mniej wydajnym niż klasyczny splicing, co w połączeniu z szybkimi podziałami komórkowymi skutkować może zmniejszeniem ogólnej liczby kolistych RNA [186]. Hipoteza ta poparta jest dodatkowo badaniami wskazującymi na akumulację circRNA w nieproliferujących, starzejących się komórkach mysiego mózgu [281]. Na podstawie otrzymanych wyników zaobserwowano również, iż istnieje grupa kolistych RNA, których poziom ekspresji w GBM jest obniżony, podczas gdy ich liniowe odpowiedniki ulegają zwiększonej ekspresji. Jest to zgodne z doniesieniami literaturowymi, które wskazują, iż poziom ekspresji niektórych circRNA jest negatywnie skorelowany z poziomem ekspresji ich rodzicielskich odpowiedników. W tym przypadku liniowe transkrypty często odpowiedzialne są za regulację procesów związanych z progresją nowotworu – mechanizm ten więc powoduje preferencyjne powstawanie cząsteczek mRNA kosztem ekspresji circRNA [221].

Do walidacji wyników uzyskanych na drodze sekwencjonowania RNA wybrano losowe circRNA o najwyższym i najniższym poziomie ekspresji w GBM w porównaniu do próbek kontrolnych zdrowego mózgu. Wyniki otrzymane z użyciem techniki qPCR w dużej mierze potwierdziły zmianę poziomu ekspresji wybranych cząsteczek wskazaną przez analizę RNA-seq. Rozbieżności wynikające z dokładnego poziomu ekspresji mogą wynikać z efektu nazywanego „*rolling circle RT*”, który polega na tym, że podczas odwrotnej transkrypcji synteza cDNA na matrycy circRNA może powodować powstawanie długich konkatamerów fałszywie zwiększających liczbę regionów BSJ, które poddawane są amplifikacji podczas reakcji qPCR [131,282]. Jednym z circRNA o najwyższym poziomie ekspresji był circVCAN, którego nadekspresję zaobserwowano także w raku żołądka i komórkach GBM opornych na radioterapię. Przedstawione w literaturze obniżenie poziomu ekspresji tego circRNA powodowało zahamowanie proliferacji i migracji oraz przyspieszoną apoptozę poprzez regulację biodostępności miR-587 i miR-1183 [283,284]. Kolejnym circRNA, w przypadku, którego przeprowadzona walidacja wykazała podwyższony poziom ekspresji był circPLOC2 - w literaturze wskazuje się na jego potencjalną rolę biomarkera w GBM, a także w raku okrężnicy [285,286].

Korelacja między formą kolistą a liniową może świadczyć o potencjalnej roli oraz biogenezie obu cząsteczek. Koliste RNA w stosunku do swoich transkryptów rodzicielskich pełnią często synergistyczną rolę i są ważnymi regulatorami procesów związanych z nowotworzeniem. Ponadto circRNA mogą promować lub hamować ekspresję form liniowych

poprzez oddziaływanie z różnego rodzaju białkami lub miRNA [201,287-289]. Istnienie korelacji między poziomami ekspresji circRNA i linRNA może wskazywać na ich wzajemną zależność w regulacji swojej biogenezy, natomiast brak korelacji sugeruje, że na ich powstawanie większy wpływ mają białkowe czynniki *trans*, takie jak RBP [290]. Ponadto negatywna korelacja między obydwoma cząsteczkami, w przypadku której poziom ekspresji formy liniowej jest znacznie podwyższony, wskazywać może na preferencyjny wybór drogi klasycznego splicingu kosztem backsplicingu [186]. Przeprowadzona analiza korelacji między formą kolistą, a liniową wybranych kandydatów wykazała, iż poziom ekspresji większości walidowanych circRNA nie jest istotnie skorelowany z poziomem ekspresji formy liniowej. Wyjątkiem był circATXN10, co wskazywać może na wzajemną zależność w biogenezie jego transkryptów.

Przeprowadzona analiza umożliwiła również identyfikację circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji w guzach wtórnych w porównaniu do guzów pierwotnych GBM. CircEGFR posiadał największy poziom ekspresji spośród trzech zidentyfikowanych kandydatów. Został on już opisany jako onkogenny circRNA wpływający na inwazję GBM poprzez interakcję z miR-1827 [291]. Zidentyfikowane circRNA są obiecującymi cząsteczkami, które mogą być zaangażowane w progresję glejaka, jednak ze względu na ograniczoną liczbę próbek guzów wtórnych użytych w sekwencjonowaniu, analiza ta powinna być traktowana jako wstępna, a w celu jej potwierdzenia, poziom ekspresji wybranych circRNA musi zostać zbadany na większej liczbie próbek.

5.2. Profil ekspresji transkryptów RBP w GBM

5.2.1. Potencjalne interakcje kolistych RNA i białek wiążących RNA w GBM

Doniesienia literaturowe wskazują na istotną rolę interakcji między białkami wiążącymi RNA, a kolistymi RNA podczas ich biogenezy, co jest ważnym czynnikiem regulującym równowagę w profilu ekspresji tych cząsteczek [147,292]. Sugeruje się także, iż circRNA mogą nie tylko wiązać miRNA, ale także RBP, co wpływać może na ich biodostępność i funkcjonalność [153,166,187,293-298]. Nadal jednak brak systematycznej analizy dotyczącej interakcji między circRNA i RBP w GBM. Biorąc pod uwagę wielopłaszczyznowy potencjał oddziaływania kolistych RNA na procesy komórkowe oraz możliwy udział RBP w regulacji ich ekspresji zrozumienie tych interakcji oraz sieci powiązań może mieć duży wpływ na lepsze zrozumienie biologii GBM [299,300]. W związku z tym, w niniejszej pracy, korzystając z danych otrzymanych z sekwencjonowania RNA guzów GBM oraz próbek zdrowego mózgu, skupiono się na zbadaniu wzajemnej relacji między circRNA i

RBP. Przeprowadzone analizy wskazały, iż znaczna część ze znanych ludzkich transkryptów RBP posiada zmieniony profil ekspresji w GBM. Określono także, że motywy wiążące RBP w przypadku circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji bogate były w reszty G i C, a circRNA o obniżonym poziomie ekspresji – w reszty U. Co ciekawe, wcześniejsze doniesienia wskazują, iż RBP preferencyjnie wiążące się z motywami bogatymi w reszty G posiadają funkcje aktywatorów splicingu. Może to wskazywać na rolę zidentyfikowanych w niniejszej pracy RBP w promowanie cyrkularyzacji kolistych RNA i ich aktywny udział w backsplicingu [248]. Wyjątkowo interesujące w tym aspekcie są RBP o podwyższonym poziomie ekspresji w GBM wiążące się ze wspomnianymi motywami bogatymi w G obecnymi w circRNA, które także posiadają zwiększony poziom ekspresji w guzach, takie jak białko SRSF1. W tym przypadku jego udział w postawianiu kolistych RNA takich jak circSMARCA5 oraz circATP5B został już eksperymentalnie potwierdzony [230,301]. Z drugiej strony doniesienia literaturowe wskazują, iż motywy bogate w reszty U są skorelowane z szybszym tempem degradacji RNA [302]. Kolisty RNA zidentyfikowane w niniejszej pracy jako cząsteczki o obniżonym w GBM poziomie ekspresji, cechowały się wzbogaceniem w reszty U, co mogłoby potencjalnie tłumaczyć ich zmieniony profil ekspresji w tym nowotworze.

W kolejnej analizie określono korelację między poziomami ekspresji transkryptów RBP i circRNA. Umożliwiło to identyfikację białek z rodziny ELAV, które wykazują obniżony profil ekspresji w GBM i są pozytywnie skorelowane z największą liczbą circRNA charakteryzujących się zmniejszonym poziomem ekspresji w tym nowotworze. Doniesienia literaturowe wskazują, iż białka ELAV rozpoznają elementy bogate w AU w 3' UTR transkryptów i w ten sposób regulują ich ekspresję [303]. Co ciekawe, przeprowadzone analizy wskazały, iż ELAVL2 i ELAVL4 wykazują negatywną korelację z liniowymi transkryptami, przy jednoczesnej pozytywnej korelacji z ich kolistymi odpowiednikami. Może to wskazywać na ważną rolę tych białek w dyskryminacji pomiędzy splicingiem a backsplicingiem.

Kolejną rodziną białek, która według przeprowadzonych analiz może mieć potencjalny wpływ na poziom ekspresji circRNA są białka CPEB. Są one odpowiedzialne za transport mRNA, a także odgrywają ważną rolę w rozwoju i funkcjonowaniu układu nerwowego [304]. Zarówno CPEB1 jak i CPEB3 wykazały obniżony poziom ekspresji w guzach GBM i wiązanie się z regionami bogatymi w reszty U znajdującymi się w sekwencjach circRNA o zmniejszonym poziomie ekspresji. Obserwacje te są potencjalnie

cennymi wskazówkami wskazującymi na ważną rolę białek wiążących RNA w regulacji profilu ekspresji circRNA w GBM.

5.2.2. Białka wiążące RNA a podtypy molekularne GBM

Istnieje kilka klasyfikacji GBM opartych na morfologii komórek nowotworowych, występujących w nich mutacjach genetycznych i profilu ekspresji genów. Klasycznie GBM dzieli się na guzy pierwotne oraz wtórne. Te pierwsze powstają *de novo*, są wyjątkowo heterogenne i rzadko posiadają mutację genu *IDH1*, podczas gdy guzy wtórne rozwijają się poprzez transformację glejaków o niższym stopniu złośliwości i często charakteryzują się mutacją *IDH1* [305]. Kolejny zaproponowany podział molekularny zakłada klasyfikację GBM ze względu na profil ekspresji genów, co wpływa na prognozy kliniczne i pozwala przewidzieć odpowiedź na standardowe leczenie. Obejmuje on podtyp klasyczny, proneuralny, neuralny i mezenchymalny. W tym pierwszym obecne są liczne amplifikacje genu *EGFR* oraz delecje chromosomu 10, podtyp proneuralny charakteryzuje się obecnymi mutacjami *IDH1* oraz *PDGFRA*, neuralny - mutacjami genów *NEFL*, *GABRI*, *SLC12A5* i *SYTI*, natomiast najbardziej agresywny i oporny na leczenie podtyp mezenchymalny posiada mutacje inaktywujące gen *NFI* [306]. W 2013 roku Brennan i współpracownicy, w ślad za podtypami molekularnymi zaproponowanymi przez Verhaacka, podjęli próbę stworzenia klasyfikacji w oparciu o profil metylacji GBM [51]. Lepsze zrozumienie globalnego tła molekularnego tego nowotworu jest niezwykle ważne, ponieważ indywidualne podejście do każdego przypadku może być kluczowe w personalizacji leczenia i dokładniejszego prognozowania całkowitego przeżycia.

W przeprowadzonej analizie dokonano klasyfikacji guzów GBM, na podstawie których wykonane zostało sekwencjonowanie RNA, do znanych podtypów molekularnych – proneuralnego, neuralnego, mezenchymalnego i klasycznego. Pozwoliło to na zidentyfikowanie ponad 40 transkryptów RBP, których profil ekspresji mógłby zostać powiązany z wymienionymi podtypami – wśród nich znalazły się wcześniej już wspomniane białka z rodziny ELAV oraz CBEP. Ponadto określono RBP o zmienionym profilu ekspresji, które były zdolne do grupowania tkanek GBM w dwie nowe grupy, takie jak białka z rodziny CPEB, IGF2BP czy RBM. Stratyfikacja guzów na podstawie profilu ekspresji transkryptu ELAVL3 ujawniła natomiast podział guzów na trzy grupy. Przeprowadzona analiza może być podstawą do stworzenia nowej klasyfikacji molekularnej GBM w oparciu o profil ekspresji białek wiążących RNA, a także uzupełnienia znanej już stratyfikacji.

5.3. Rola wybranych kolistych RNA w GBM

W ostatnich latach w badaniach nad rolą kolistych RNA w nowotworzeniu skupiono się na circRNA o podwyższonym poziomie ekspresji i ich potencjalnym działaniu onkogennym [307,308]. W niniejszej pracy, ze względu na zidentyfikowane globalne obniżenie poziomu ekspresji znacznej większości circRNA w GBM, przeprowadzono analizę właśnie tych cząsteczek. Spośród kandydatów circRNA, ze względu na funkcje ich liniowych odpowiedników oraz wyniki uzyskane na podstawie przeprowadzonej walidacji, wyselekcjonowano circATXN10 oraz circFAM188A. Białko ATXN10 bierze udział w dojrzewaniu neuronów, odgrywa także ważną rolę w procesie glikolizacji. Ponadto ekspansje powtórzeń ATTCT i ATTCC w genie ATXN10 są powodem rozwoju ataksji rdzeniowo-mózdkowej typu 10 [309]. Nieliczne doniesienia literaturowe dotyczące circATXN10 wskazują na podwyższony poziom ekspresji tej cząsteczki u pacjentów cierpiących na kardiomiopatię zastoinową oraz obniżoną ekspresję w nowotworze gruczołu krokowego [310,311]. W przypadku białka FAM188A znana jest jego rola w regulacji apoptozy [312]. Jedyne badania dotyczące circFAM188 wskazują z kolei na jego podwyższony poziom ekspresji w plazmie pacjentów chorych na raka żołądka [313].

Dostępne metody służące potwierdzaniu kolistej struktury circRNA obejmują trawienie RNA rybonukleazą R, która degradowuje jedynie liniowe cząsteczki oraz sekwencjonowanie obszaru obejmującego BSJ kolistych RNA [314]. Obie wymienione metody potwierdziły kolistą strukturę wybranych kandydatów, ponadto odnotowano duże różnice w poziomach ekspresji obu circRNA w różnych liniach komórkowych GBM. Co ciekawe zaobserwowano, iż w przypadku transkryptów ATXN10 liczba kolistych cząsteczek w zdrowym mózgu była większa niż liczba cząsteczek mRNA, natomiast w GBM zależność ta była odwrócona – linATXN10 ilościowo dominował nad circATXN10. Warto również odnotować fakt, iż pomimo obniżonego poziomu ekspresji circRNA w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu, bezwzględna liczba jego cząsteczek pozostawała nadal na bardzo wysokim poziomie. Może to wskazywać na odmienne role obu transkryptów w procesach związanych z rozwojem GBM. Podobne relacje między zmianami we współczynniku występowania kolistego i liniowego RNA zaobserwowano już w przypadku kilki circRNA w raku prostaty [315]. Kolejnym ciekawym przykładem może być też circMBL, w przypadku którego udowodniono istotną rolę wzajemnej regulacji poziomów ekspresji transkryptu liniowego i kolistego. Introny oskrzydłające sekwencję circMBL posiadają miejsca wiązania dla białka MBL, które promuje jego cyrkularyzację. W sytuacji nadmiaru białka MBL w

komórkach circMBL powstaje preferencyjnie, co jednocześnie obniża poziom jego liniowej formy – w tej sytuacji backsplicing dominuje nad klasycznym splicingiem, dzięki czemu w komórce zachowana zostaje równowaga [124].

Mechanizm działania kolistych RNA jest ściśle związany z ich subkomórkową lokalizacją. CircRNA obecne w cytoplazmie najczęściej wpływają na regulację działania białek, biodostępność microRNA, stabilność mRNA, a także na translację. Z drugiej strony circRNA dużo rzadziej występują w jądrze komórkowym i często są tam zaangażowane w regulację transkrypcji i splicingu [258,316]. Ponadto umiejscowienie circRNA w poszczególnych kompartmentach jest najczęściej związane z jego typem – egzonowe circRNA znajdują się głównie w cytoplazmie, a intronowe w jądrze komórkowym. Zarówno badane circATXN10 jak i circFAM188A zostały zlokalizowane w cytoplazmie, co było podstawą i pierwszym krokiem w dalszym badaniu mechanizmu ich działania.

W guzach GBM występują charakterystyczne obszary nekrozy spowodowane niedoborem tlenu. W niszach tych występują licznie komórki macierzyste glejaka, które odpowiedzialne są za progresję guza, naciekanie sąsiednich tkanek, a także rozwój chemiooporności. Hipoksja ma ogromne znaczenie dla GSC, gdyż promuje ich plastyczność i agresywność, a także pozwala utrzymywać fenotyp i cechy molekularne typowe dla komórek macierzystych [317]. Standardowo używane w badaniach komórki adherentne mogą nierzadko zaburzać rzeczywisty obraz procesów toczących się w guzie GBM, ze względu na brak trójwymiarowej struktury i tworzenia się niszy hipoksyjnej [318]. Dlatego też część z przedstawionych w niniejszej pracy eksperymentów wykonana została na sferach wyprowadzonych z linii komórkowych GBM, które zdecydowanie lepiej oddają rzeczywistą naturę tego guza.

5.3.1. CircATXN10

Jednym ze sposobów badania funkcji circRNA jest eksperyment typu „utrata funkcji”, który polega na obniżeniu poziomu ekspresji transkryptów za pomocą siRNA i obserwację wpływu tych zmian na poziomie molekularnym oraz fenotypowym. siRNA są zaprojektowane w taki sposób, aby były zdolne do specyficznego przyłączania się do kolistego RNA w rejonie zawierającym BSJ, a więc miejscu łączenia końca 5' z końcem 3', tak by celować jedynie w circRNA, a nie w transkrypt liniowy. W tym podejściu należy również obniżyć poziom ekspresji formy liniowej, aby jeszcze dokładniej zbadać rolę i relacje między obydwoma transkryptami, a także określić czy ich działania jest synergistyczne, czy

antagonistyczne [314]. Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki wskazały, iż poziom ekspresji mRNA ATXN10 ulegał podwyższeniu po wyciszeniu formy kolistej i odwrotnie – forma kolista była nadekspresjonowana w przypadku obniżenia poziomu transkryptu liniowego. Wyniki te nie były jednak jednoznaczne w obu liniach GBM – U251-MG oraz U138-MG. Dlatego też zdecydowano się przeprowadzić ten sam eksperyment na dodatkowej, trzeciej linii – U87-MG, która charakteryzuje się zwiększoną subpopulacją komórek macierzystych glejaka, a więc lepiej imituje właściwy profil molekularny guza GBM. W tym przypadku zaobserwowano, iż ekspresja każdej z form transkryptu ATXN10 ulega podwyższeniu w sytuacji, kiedy przeciwna forma jest wyciszana przez siRNA. Otrzymane wyniki wskazały na konieczność zastosowania sfer, które tak jak linia U87-MG wzbogacone są w GSC i lepiej imitują procesy zachodzące w guzach GBM. Dlatego też określono zmiany ekspresji transkryptów ATXN10 w sferach wyprowadzonych z linii U251-MG oraz U138-MG, co potwierdziło wstępne obserwacje o współzależności ekspresji circATXN10 i linATXN10 i było zgodne z wynikami otrzymanymi z użyciem linii U87-MG. Różnice w wynikach pomiędzy poszczególnymi liniami komórkowymi wynikać mogły z ogromnej heterogenności GBM i różnic molekularnych nie tylko w obrębie jednego guza, ale również między guzami różnych pacjentów.

W następnym kroku, aby potwierdzić zaobserwowaną zależność, zastosowano podejście typu „nabycie funkcji”, a więc zwiększenie ekspresji circATXN10. W tym celu użyto wektora zawierającego sekwencje Alu, które wzmagają cyrkularyzację umieszczonego w nim insertu [260]. Otrzymane wyniki były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, a podsumowanie zebranych wyników zostało zawarte w tabeli numer 27.

Tabela 27. Wzajemny wpływ modyfikacji poziomu ekspresji circATXN10 oraz linATXN10.

Wyciszenie circATXN10					
	U251-MG	U138-MG	U87-MG	U251-MG neurosfery	U138-MG neurosfery
Poziom linATXN10	Bez zmian	↑	↑	↑	↑
Wyciszenie linATXN10					
	U251-MG	U138-MG	U87-MG	U251-MG neurosfery	U138-MG neurosfery
Poziom circATXN10	↑	Bez zmian	↑	↑	↑
Nadekspresja circATXN10					
	U251-MG	U138-MG	U87-MG		
Poziom linATXN10	Bez zmian		↓	↓	

Przeprowadzony eksperyment typu „pulldown”, z użyciem sond komplementarnych do liniowej i kolistej formy ATXN10, pozwolił potwierdzić wzajemne wiązanie się obu cząsteczek. Wskazało to na ich potencjalną interakcję, która może mieć wpływ na wzajemną regulację poziomów ekspresji. Istnieją doniesienia o tego typu zależnościach i mechanizmach kontroli między ekspresją formy kolistej i liniowej – circSEPALATA3 reguluje poziom swojego odpowiednika mRNA na poziomie splicingu, circSTAT3 wpływa na liniową formę STAT3 poprzez wiązanie się z miRNA, a circPABPN1 bierze udział w koordynowaniu procesu translacji swojego liniowego odpowiednika [165,166,319]. Biorąc pod uwagę lokalizację circATXN10 w cytoplazmie założono hipotezę o regulacji ekspresji transkryptu liniowego poprzez wpływ na jego stabilność lub poprzez oddziaływanie z innymi białkami.

Wspomniany eksperyment typu „pulldown” umożliwił również wykonanie analizy spektrometrii mas i identyfikację białek wchodzących w interakcję z formą kolistą i liniową ATXN10. Otrzymane wyniki wskazały, iż liniowa forma ATXN10 wchodzi w interakcję z białkami z rodziny RPA oraz białkiem PPARD. Białka RPA biorą udział w replikacji oraz rekombinacji poprzez wiązania się z jednoniciowym DNA. Co ciekawe udowodniono ich istotną rolę w rozwoju oporności komórek macierzystych glejaka na radioterapię. Ponadto poziom białek z tej rodziny jest znacznie podwyższony w guzach GBM oraz koreluje ze złymi rokowaniami i krótszym przeżyciem [320]. Białka PPARD z kolei należą do grupy steroidowych receptorów jądrowych regulujących transkrypcję wielu ważnych genów odpowiedzialnych za proces mielinizacji, regulację metabolizmu lipidów i różnicowanie

komórek naskórka. Zostały również zidentyfikowane jako ważne czynniki promujące rozwój nowotworu piersi poprzez redukcję stresu oksydacyjnego [321,322]. W przypadku formy kolistej ATXN10 zidentyfikowano interakcję z białkami z rodziny U2AF, które wchodzi w skład kompleksu rybonukleoproteinowego biorącego udział w splicingu. Ich rola w nowotworzeniu opiera się głównie na promowaniu alternatywnego splicingu, jednak istnieją również doniesienia wskazujące na niekanoniczny mechanizm działania tych białek polegający na hamowaniu translacji [323,324]. Uzyskane wyniki oraz wymienione doniesienia literaturowe pozwoliły na postawienie hipotezy zakładającej działanie obu badanych transkryptów poprzez zidentyfikowane białka, co potencjalnie może mieć wpływ zarówno na wzajemną regulację ekspresji kolistej i liniowej formy ATXN10, jak i na procesy związane z rozwojem GBM. Nadal jednak niezbędne jest przeprowadzenie dalszych eksperymentów, które mogłyby wyjaśnić dokładniejszy mechanizm oddziaływania obu transkryptów ze zidentyfikowanymi białkami.

Wykonane testy funkcjonalne po wyciszeniu circATXN10 oraz linATXN10 za pomocą siRNA pozwoliły stwierdzić, iż obie formy transkrypcyjne mają wpływ na migrację i inwazję komórek GBM. Wyciszenie formy liniowej ATXN10 powodowało znaczne podwyższenie tempa migracji komórek obserwowano zarówno w teście zarastania rany jak i za pomocą systemu Xcelligence. Ponadto przeprowadzony test formowania sfer wskazał na zwiększony potencjał inwazyjny komórek z obniżonym poziomem linATXN10, co świadczy również o wzmożonym multipotentnym charakterze obecnych w sferze komórek macierzystych guza. Zupełnie odwrotne wyniki uzyskano w przypadku wyciszenia formy kolistej ATXN10 – tempo migracji i inwazji było w tym przypadku obniżone, jednak zmiany te były zdecydowanie mniejsze niż przy wyciszeniu formy liniowej. Może to być spowodowane faktem, iż realny wpływ na procesy związane z GBM ma forma liniowa ATXN10, a wpływ circATXN10 jest pośredni i polega na wcześniej zaobserwowanym podwyższeniu poziomu ekspresji formy liniowej. Wyniki te potwierdzono ponadto za pomocą pomiaru poziomu ekspresji markerów EMT, w przypadku których zaobserwowano ich wzrost po wyciszeniu linATXN10 i spadek po obniżeniu poziomu ekspresji circATXN10. Udowodniono też, iż obie formy ATXN10 nie wpływają na tempo proliferacji, ponieważ nie zaobserwowano zmian w dystrybucji komórek GBM w cyklu komórkowym.

Istnieje interesująca hipoteza „*go or grow*” opisująca dychotomiczną relację między migracją i proliferacją komórek GBM. Jest to związane z faktem, iż procesy te charakteryzują się wspólnymi szlakami sygnałowymi, w związku z czym nie mogą występować

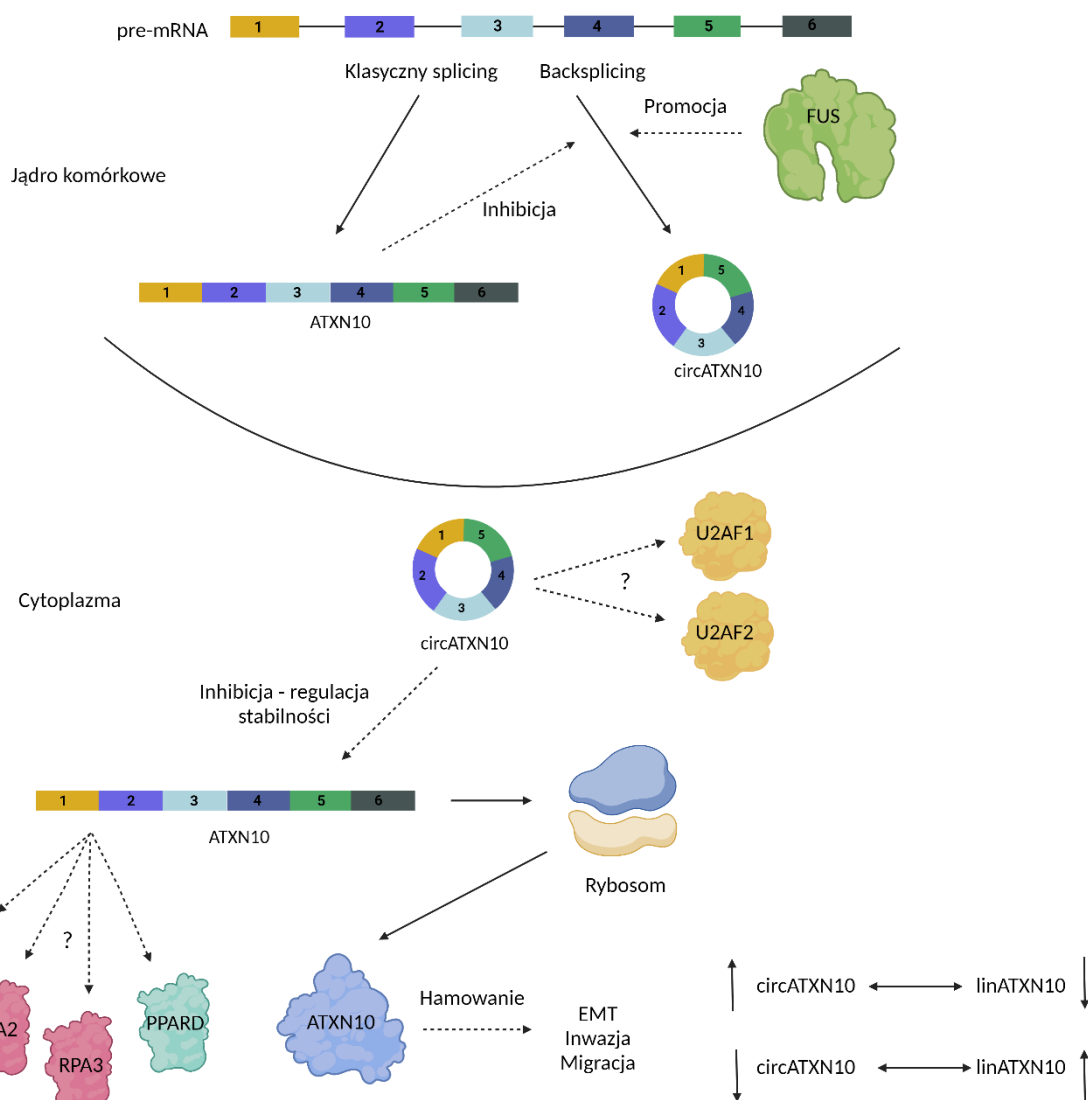
równocześnie [325,326]. Dlatego też komórki GBM odznaczające się wysoką ruchliwością mają zwykle niższy poziom proliferacji i odwrotnie. Inne badanie przeprowadzone przez Hatzikirou i współpracowników wskazało, iż środowisko niedoboru tlenu może być odpowiedzialne za zmianę fenotypu komórek z proliferacyjnego na inwazyjny, odpowiadający za naciekanie sąsiednich, zdrowych tkanek [327]. Co ciekawe udokumentowano liczne przypadki wpływu circRNA na procesy związane z progresją GBM, jednak większość z nich opiera się na interakcjach z miRNA, niewiele z nich opisuje natomiast wpływ na procesy komórkowe związane z regulacją równowagi pomiędzy kolistą a liniową formą transkryptu [276].

W celu dokładniejszego określenia molekularnych podstaw zaobserwowanych zmian, przeprowadzono sekwencjonowanie RNA po wyciszeniu linATXN10 i circATXN10 w liniach U251-MG, U138-MG oraz U87-MG. Otrzymane wyniki wskazały na globalną deregulację ekspresji genów – zaobserwowano jednocześnie, iż istnieją duże różnice pomiędzy liniami komórkowymi, co spowodowane było prawdopodobnie ogromną heterogennością guzów GBM. Sprawia ona, iż guzy, a co za tym idzie linie komórkowe, charakteryzują się różnorodnością molekularną i wykazywać mogą różne cechy [328]. Dlatego też zdecydowano się wyselekcjonować geny, których poziom ekspresji był zmieniony we wszystkich trzech użytych liniach komórkowych. W przypadku wyciszenia liniowej formy ATXN10 zaobserwowano geny o podwyższonym poziomie ekspresji, których onkogenna rola w GBM została już określona w dostępnej literaturze. Jest to zgodne wcześniej otrzymanymi wynikami, wskazującymi, iż linATXN10 cechuje się działaniem hamującym procesy związane z rozwojem glejaka. Jednym ze zidentyfikowanych transkryptów o podwyższonym poziomie ekspresji był GALBT7, który promuje inwazję komórek GBM poprzez modulację cytoszkieletu [329]. Podobnie SPARC, wpływa na ECM oraz propaguje naciekanie sąsiadujących zdrowych tkanek przez komórki nowotworowe [330]. Ponadto zaobserwowano obniżenie poziomu ekspresji genów o potwierdzonej supresorowej roli w GBM. To między innymi CDC14B, którego wysoki poziom ekspresji koreluje z wysokim współczynnikiem przeżycia wolnego od progresji, a także współczynnikiem przeżycia całkowitego w przypadku GBM [331]. Z kolei LITAF zwiększa wrażliwość komórek GBM na radioterapię [332]. Co ciekawe, odnotowano także obniżenie poziomu transkryptu kodującego białko RPA1, które w analizie spektrometrii mas próbek po eksperymencie typu „pulldown” zidentyfikowane zostało jako potencjalny interaktor transkryptu liniowego ATXN10.

W przypadku wyciszenia circATXN10 zidentyfikowano mniejszą liczbę genów o zmienionym profilu ekspresji w porównaniu do wyciszenia linATXN10. Niemniej jednak zaobserwowano podwyższenie poziomu ekspresji TGFBR1 i MAPK6 - ważnych regulatorów cyklu komórkowego. Ponadto odnotowano też obniżenie poziomu ekspresji POGK, którego ekspresja została skorelowana ze złymi rokowaniami u pacjentów z rakiem wątrobowokomórkowym [333].

Odnotowano, iż największy efekt deregulacji profilu ekspresji wybranych genów obserwuje się w przypadku linii U87-MG. W tej samej linii zidentyfikowana została też najsilniejsza zależność pomiędzy poziomami ekspresji transkryptów ATXN10 po wyciszeniu każdego z nich za pomocą siRNA. Może to sugerować, iż najbardziej reprezentatywne wyniki otrzymano właśnie w tej linii GBM.

Wykonane w ramach pracy doktorskiej badania wykazały, iż liniowa forma ATXN10 charakteryzuje się działaniem supresorowym, a kolista – onkogennym. Największe różnice w tempie migracji oraz inwazji komórek zaobserwowano jednak po wyciszeniu transkryptu liniowego. Może być to związane z faktem, iż kolista cząsteczka ATXN10 wpływa na procesy związane GBM pośrednio poprzez regulację poziomu ekspresji formy liniowej, która jest potencjalnie bezpośrednim czynnikiem regulującym EMT – wyciszenie formy kolistej skutkowało bowiem zwiększeniem poziomu ekspresji formy liniowej. Schemat potencjalnego działania obu cząsteczek oraz ich wzajemnej relacji został przedstawiony na poniższej rycinie.



Rycina 50. Schematyczna ilustracja relacji między circATXN10 i linATXN10 oraz ich potencjalnego działania w komórkach GBM.

Istnieją dowody na wykształcanie przez komórki mechanizmów obronnych mających na celu odwrócenie procesów związanych z nowotworzeniem. Może być to związane z działaniem systemów naprawczych DNA, a także zwiększoną produkcją czynników hamujących proliferację i migrację [334,335]. Forma liniowa ATXN10 charakteryzuje się zwiększonym w GBM poziomem ekspresji w porównaniu do zdrowego mózgu, natomiast kolista – zmniejszonym. Biorąc pod uwagę charakter działania obu tych form na procesy związane z rozwojem GBM można przypuszczać, iż zmiana równowagi w ekspresji circATXN10 i linATXN10 w glejaku w porównaniu do zdrowego mózgu może być związana

z procesami kompensacyjnymi mającymi na celu zahamowanie kancerogenezy. Niemniej jednak hipoteza ta wymaga dalszych badań, które mogłyby ujawnić dokładny mechanizm stojący za tym zjawiskiem.

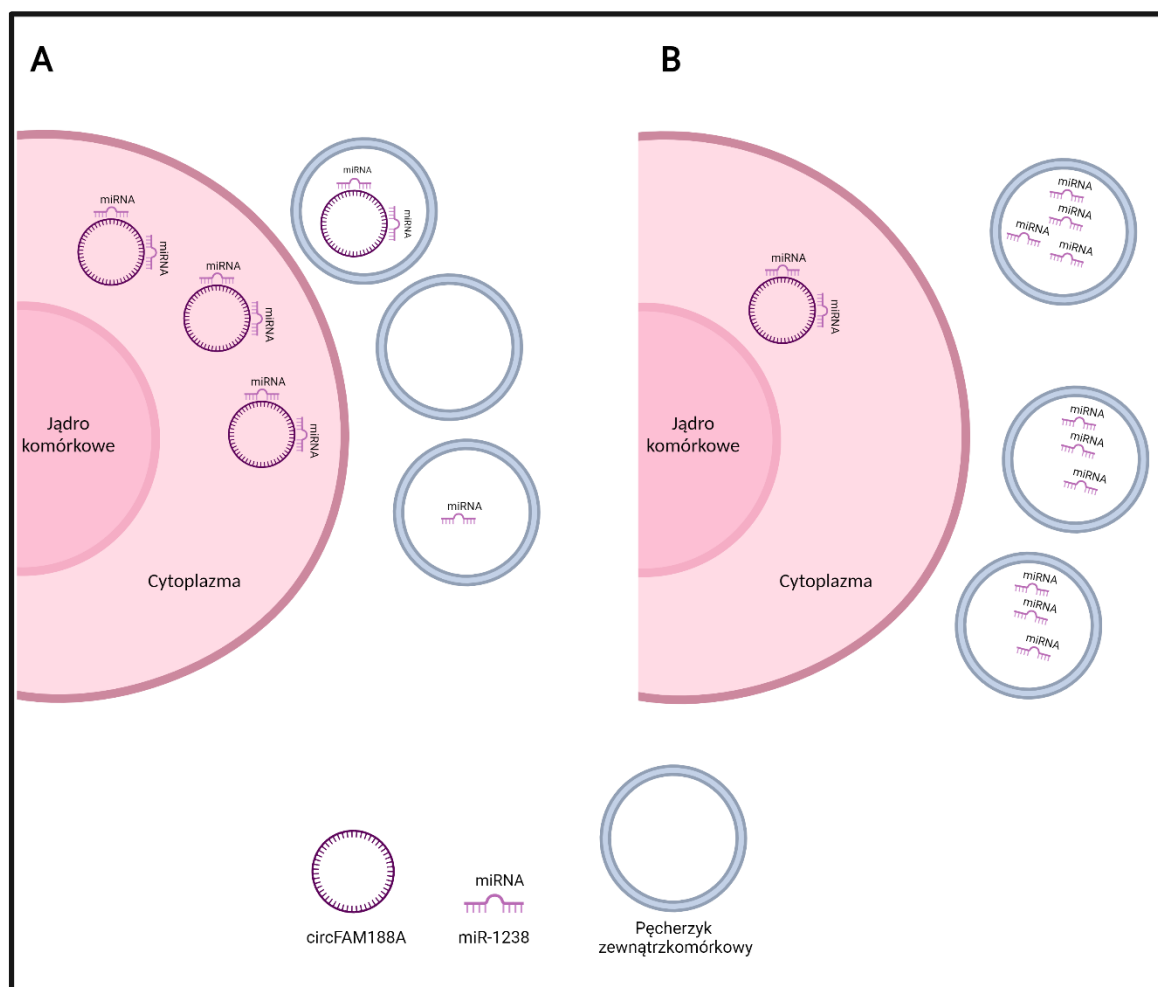
5.3.2. CircFAM188A

Jak wspomniano wcześniej, najczęstszym mechanizmem działania circRNA jest wiązanie miRNA. Przeprowadzona analiza potencjalnych miejsc wiązania drugiego z badanych kandydatów – circFAM188A, wskazała, iż posiada on dwa miejsca wiązania zarówno z miR-1238 jak i miR-576. Ten pierwszy był wyjątkowo interesujący ze względu na obecne doniesienia literaturowe wskazujące na jego udział w rozwoju chemiooporności komórek GBM. Co ciekawe poziom miR-1238 był podwyższony w serum pacjentów chorych na glejaka, a jego obecność potwierdzono w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych ulegających sekrecji z komórek wykazujących oporność na temozolomid [262]. W badaniach przeprowadzonych w ramach niniejszej rozprawy określono, iż poziom miR-1238 w tkankach GBM był znacznie podwyższony. Potwierdzono też potencjalną interakcję circFAM188A z miR-1238 poprzez immunoprecypitację białka AGO2, które wchodzi w skład kompleksu RISC odpowiadającego za wyciszanie ekspresji genów na drodze interferencji RNA. Co więcej przeprowadzony eksperyment typu „pulldown” pozwolił na potwierdzenie wiązania się kolistej formy FAM188A i badanego miRNA.

W dalszych badaniach określono wpływ obniżenia i podwyższenia poziomu ekspresji circFAM188A na poziom miR-1238. Zaobserwowano, iż zmniejszony poziom ekspresji circFAM188A spowodował obniżenie poziomu miR-1238, natomiast nadekspresja circFAM188A za pomocą wektora skutkowała podwyższeniem poziomu tego miRNA.

Rozwój chemiooporności w GBM jest ściśle związany z komórkami macierzystymi guza i środowiskiem niedoboru tlenu. Mir-1238 wpływa na rozwój chemiooporności poprzez szlak związany z kaweoliną i receptorem naskórkowego czynnika wzrostu, których ekspresja z kolei może być regulowana przez warunki hipoksyjne [262,336,337]. Dlatego też, w niniejszej rozprawie, skupiono się na wpływie niedoboru tlenu na circFAM188A i miR-1238. W pierwszej kolejności określono poziomy ekspresji obu tych cząsteczek w komórkach hodowanych w warunkach normalnych i warunkach hipoksyjnych. Zaobserwowano, iż poziom miR-1238 w komórkach hodowanych w niedoborze tlenu zmniejsza się, natomiast poziom circFAM188A jest podwyższony. W związku z wcześniejszymi doniesieniami o sekrecji miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych postanowiono określić poziom

ekspresji obu cząsteczek w EV znajdujących się w medium komórkowym. W tym przypadku zaobserwowano podwyższony poziom zarówno miR-1238 jak i circFAM188A w EV ulegających sekrecji z komórek poddanych hodowli w warunkach niedoboru tlenu. Obserwacje te pozwoliły postawić hipotezę o regulacji sekrecji miR-1238 przez circFAM188A. W przypadku nadekspresji tego kolistego RNA, poziom miR-1238 w komórkach ulegał zwiększeniu potencjalnie ze względu na jego wiązanie i retencję. Z drugiej strony obniżenie poziomu ekspresji circFAM188A mogło spowodować zwiększone wydzielanie miR-1238 do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, co z kolei skutkowało obniżeniem poziomu jego ekspresji w samych komórkach. Biorąc pod uwagę wcześniejsze wyniki założono, że poziom miR-1238 spada w komórkach GBM w środowisku hipoksyjnym, ponieważ są one w tym czasie nadmiernie wydzielane do macierzy zewnątrzkomórkowej za pomocą EV, gdzie ich poziom jest zwiększony. Koncepcje tę popierają doniesienia literaturowe wskazujące, iż circRNA nie wpływają na poziom ekspresji miRNA, a regulują ich biodostępność [338,339]. W badanym przypadku circFAM188A mógłby więc wpływać na biodystrybucję miR-1238 w komórkach (Ryc. 51). Ciekawym wydaje się również obserwacja zwiększonej ekspresji zarówno miR-1238 jak i circFAM188A w EV, co może wskazywać na potencjał diagnostyczny tych cząsteczek. Istnieją doniesienia na temat zasadności poszukiwać nowych biomarkerów, a te obecne w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych są wyjątkowo interesujące, ze względu na możliwość przenikania bariery krew mózg i ich detekcji w krwi pacjentów [340-343]. Niemniej jednak potwierdzenie przedstawionej hipotezy wymaga dalszych badań, takich jak test reporterów lucyferazy, które dowodziłyby ścisłej interakcji pomiędzy tymi cząsteczkami, a także próba ich identyfikacji w serum pacjentów chorych na GBM.



Rycina 51. Schematyczne przedstawienie potencjalnej interakcji między circFAM188A i miR-1238. A. Zwiększona ekspresja circFAM188A może powodować retencję miR-1238 w komórkach. **B.** Zmniejszona ekspresja circFAM188A może wpływać na zwiększoną sekrecję miR-1238 w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych.

Przeprowadzone analizy *in silico* wskazały, iż transkrypty potencjalnie wiązane przez miR-1238 zaangażowane są w szlaki związane z hipoksją oraz adhezją komórek. Jeden z nich - YTHDF2 zaangażowany jest w rozwój oporności na temozolomid przez komórki GBM. [344]. Z kolei obniżony w glejaku poziom białka CLDN14 i CADM2 powoduje zmniejszenie adhezji komórek i promuje proces inwazji [345,346]. Może to wskazywać na istotną rolę miR-1238 nie tylko w rozwoju chemiooporności, ale także procesach związanych z naciekaniem GBM na zdrowe tkanki.

5.4. Wpływ RBP na biogenezę wybranych kolistych RNA

Biogeneza circRNA jest ściśle kontrolowanym procesem, który pozwala komórce regulować równowagę między powstawaniem liniowej formy transkryptu podczas splicingu, a powstawaniem formy kolistej w przebiegu backsplicingu. Najważniejszymi czynnikami

wpływającymi na rozróżnianie obu tych procesów są odwrotnie komplementarne sekwencje w regionach oskrzydających circRNA, a także białka wiążące RNA [122]. Istnieje wiele doniesień na temat istotnej roli RBP w promowaniu backsplicingu poprzez zbliżanie do siebie intronów oskrzydających sekwencje circRNA, co może wpływać na globalny profil ekspresji circRNA w różnych nowotworach [124,266]. W związku z faktem, iż w niniejszej pracy doktorskiej skupiono się na badaniu roli circRNA o obniżonym poziomie ekspresji, zdecydowano się także na próbę określenia powodów ich deregulacji. Dlatego też, korzystając z dostępnych baz danych, określono miejsca wiązania dla RBP w regionach flankujących circATXN10 oraz circFAM188A. Zaobserwowano, iż białkami, wspólnymi dla obu kandydatów circRNA są białka FUS oraz EIF4A3. Co ciekawe istnieją doniesienia literaturowe wskazujące, iż FUS ma wpływ na globalny profil ekspresji kolistych RNA w neuronach ruchowych myszy [126]. W przypadku EIF4A3 udowodniony został z kolei jego udział w regulacji biogenezy circMMP9, który wpływa na promowanie rozwoju GBM [227,347].

Przeprowadzone w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej badania wskazały, iż manipulacja poziomem ekspresji białka FUS ma znaczący wpływ na poziom ekspresji badanych circRNA. Zaobserwowano, iż komórki z delecją genu FUS wykazują obniżony poziom ekspresji zarówno circATXN10 jak i circFAM188A. Ponadto zwiększony poziom białka FUS skutkował podwyższeniem poziomu obu kolistych RNA. W przypadku ATXN10 zaobserwowano zmiany poziomu ekspresji zarówno kolistej jak i liniowej formy, co może być związane ze zidentyfikowaną we wcześniejszych badaniach dużą korelacją między obydwoma transkryptami.

Białko FUS charakteryzuje się podwyższonym poziomem w wielu nowotworach, w tym także w guzach GBM. W świetle przeprowadzonych badań zasadne wydaje się być pytanie o rolę tego białka w pozytywnej regulacji biogenezy circRNA. Doniesienia literaturowe wskazują, iż w nowotworach białko FUS cechuje się działaniem onkogennym poprzez promowanie transkrypcji i splicingu genów zaangażowanych w progresję guza [348]. Może to wskazywać na potencjalnie większe zaangażowanie tego białka we wspomniane procesy kosztem promowania backsplicingu. Jest to interesująca możliwość, biorąc pod uwagę badania, które wskazują na mechanizmy odpowiedzialne za preferencyjne powstawanie liniowych transkryptów poprzez redukcję biogenezy circRNA [124]. Niemniej jednak, dokładna rola białka FUS w biogenezie wybranych kolistych RNA wymaga dalszych badań.

6. Wnioski i perspektywy

Celem niniejszej pracy było określenie profilu ekspresji circRNA w GBM oraz zbadanie relacji tych cząsteczek z białkami wiążącymi RNA. Ponadto wstępnie określono rolę wybranych circRNA w rozwoju i progresji GBM, a także ich oddziaływania z RBP.

Na podstawie przeprowadzonych badań:

1. Stwierdzono, że profil ekspresji circRNA w guzach GBM ulega globalnej deregulacji, a znaczną część pośród tych cząsteczek stanowią koliste RNA o obniżonym poziomie ekspresji.
2. Określono białka wiążące RNA mające potencjalny wpływ na deregulację wcześniej zidentyfikowanych circRNA. Ponadto potwierdzono, iż profil RBP może służyć do stratyfikacji guzów GBM w oparciu o znane podtypy molekularne, a także grupować tkanki według zaproponowanej nowej klasyfikacji.
3. Zbadano wpływ transkryptu kolistego i liniowego ATXN10 na rozwój GBM – określono, iż linATXN10 ma bezpośredni wpływ na procesy takie jak migracja i inwazja, natomiast circATXN10 pełni funkcje pośrednią poprzez regulację poziomu ekspresji formy liniowej. Stwierdzono, że poziom ekspresji obu form ATXN10 jest ściśle związany i regulowany, a wyciszenie ich za pomocą siRNA ma wpływ na ogólny profil ekspresji w GBM.
4. Opisano interakcję pomiędzy circFAM188A i miR-1238, która może potencjalnie pełnić rolę w procesach związanych z rozwojem chemiooporności przez komórki GBM. Określono, iż circFAM188A wpływa na biodystrybucję miR-1238 w komórkach i pęcherzykach zewnątrzkomórkowych.
5. Potwierdzono potencjalny udział białka FUS w biogenezie circATXN10 i circFAM188A, co może być podstawą do dalszych badań w celu próby wyjaśnienia zachwianej równowagi pomiędzy splicingiem a backsplicingiem.

Podsumowując, badania wykonane w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej dowodzą ważnej roli circRNA w rozwoju GBM poprzez wpływ na wiele ścieżek związanych z procesami takimi jak inwazja, migracja czy funkcja komórek macierzystych. Ponadto wskazują na potrzebę dalszej identyfikacji czynników zaangażowanych w regulację biogenezy circRNA, co w przyszłości mogłoby wyjaśnić zjawisko globalnej deregulacji tych cząsteczek w nowotworach. Niemniej jednak,

trudności w badaniu kolistych RNA oraz wyzwania związane z zawiłą naturą ich działania wskazują na ogrom wysiłku, który należy jeszcze włożyć w analizę tych cząsteczek.

7. Bibliografia

1. Louis, D.N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D.J.; Cree, I.A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H.K.; Pfister, S.M.; Reifenberger, G., et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. *Neuro Oncol* **2021**, *23*, 1231-1251, doi:10.1093/neuonc/noab106.
2. Gritsch, S.; Batchelor, T.T.; Gonzalez Castro, L.N. Diagnostic, therapeutic, and prognostic implications of the 2021 World Health Organization classification of tumors of the central nervous system. *Cancer* **2022**, *128*, 47-58, doi:10.1002/cncr.33918.
3. Miller, K.D.; Ostrom, Q.T.; Kruchko, C.; Patil, N.; Tihan, T.; Cioffi, G.; Fuchs, H.E.; Waite, K.A.; Jemal, A.; Siegel, R.L., et al. Brain and other central nervous system tumor statistics, 2021. *CA Cancer J Clin* **2021**, *71*, 381-406, doi:10.3322/caac.21693.
4. Ostrom, Q.T.; Francis, S.S.; Barnholtz-Sloan, J.S. Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors. *Curr Neurol Neurosci Rep* **2021**, *21*, 68, doi:10.1007/s11910-021-01152-9.
5. Czarnywojtek, A.; Borowska, M.; Dyrka, K.; Van Gool, S.; Sawicka-Gutaj, N.; Moskal, J.; Kosciński, J.; Graczyk, P.; Halas, T.; Lewandowska, A.M., et al. Glioblastoma Multiforme: The Latest Diagnostics and Treatment Techniques. *Pharmacology* **2023**, *108*, 423-431, doi:10.1159/000531319.
6. Grochans, S.; Cybulska, A.M.; Siminska, D.; Korbecki, J.; Kojder, K.; Chlubek, D.; Baranowska-Bosiacka, I. Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14102412.
7. Schaff, L.R.; Mellingshoff, I.K. Glioblastoma and Other Primary Brain Malignancies in Adults: A Review. *JAMA* **2023**, *329*, 574-587, doi:10.1001/jama.2023.0023.
8. Jakel, S.; Dimou, L. Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation. *Front Cell Neurosci* **2017**, *11*, 24, doi:10.3389/fncel.2017.00024.
9. Herculano-Houzel, S. The human brain in numbers: a linearly scaled-up primate brain. *Front Hum Neurosci* **2009**, *3*, 31, doi:10.3389/neuro.09.031.2009.
10. Stupp, R.; Brada, M.; van den Bent, M.J.; Tonn, J.C.; Pentheroudakis, G.; Group, E.G.W. High-grade glioma: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol* **2014**, *25 Suppl 3*, iii93-101, doi:10.1093/annonc/mdu050.
11. 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*, 803-820, doi:10.1007/s00401-016-1545-1.
12. Whitfield, B.T.; Huse, J.T. Classification of adult-type diffuse gliomas: Impact of the World Health Organization 2021 update. *Brain Pathol* **2022**, *32*, e13062, doi:10.1111/bpa.13062.
13. Li, K.; Lu, D.; Guo, Y.; Wang, C.; Liu, X.; Liu, Y.; Liu, D. Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States, 1973-2014. *Cancer Med* **2018**, *7*, 5281-5290, doi:10.1002/cam4.1757.
14. Carrano, A.; Juarez, J.J.; Incontri, D.; Ibarra, A.; Guerrero Cazares, H. Sex-Specific Differences in Glioblastoma. *Cells* **2021**, *10*, doi:10.3390/cells10071783.
15. Berger, T.R.; Wen, P.Y.; Lang-Orsini, M.; Chukwueke, U.N. World Health Organization 2021 Classification of Central Nervous System Tumors and Implications for Therapy for Adult-Type Gliomas: A Review. *JAMA Oncol* **2022**, *8*, 1493-1501, doi:10.1001/jamaoncol.2022.2844.
16. Hanif, F.; Muzaffar, K.; Perveen, K.; Malhi, S.M.; Simjee Sh, U. Glioblastoma Multiforme: A Review of its Epidemiology and Pathogenesis through Clinical Presentation and Treatment. *Asian Pac J Cancer Prev* **2017**, *18*, 3-9, doi:10.22034/APJCP.2017.18.1.3.
17. Kim, S.J.; Lim, H.K.; Lee, H.Y.; Choi, C.G.; Lee, D.H.; Suh, D.C.; Kim, S.M.; Kim, J.K.; Krauss, B. Dual-energy CT in the evaluation of intracerebral hemorrhage of unknown origin: differentiation between tumor bleeding and pure hemorrhage. *AJNR Am J Neuroradiol* **2012**, *33*, 865-872, doi:10.3174/ajnr.A2890.
18. Bernstock, J.D.; Gary, S.E.; Klinger, N.; Valdes, P.A.; Ibn Essayed, W.; Olsen, H.E.; Chagoya, G.; Elsayed, G.; Yamashita, D.; Schuss, P., et al. Standard clinical approaches and

- emerging modalities for glioblastoma imaging. *Neurooncol Adv* **2022**, *4*, vdac080, doi:10.1093/noajnl/vdac080.
19. Parker, N.R.; Khong, P.; Parkinson, J.F.; Howell, V.M.; Wheeler, H.R. Molecular heterogeneity in glioblastoma: potential clinical implications. *Front Oncol* **2015**, *5*, 55, doi:10.3389/fonc.2015.00055.
 20. D'Alessio, A.; Proietti, G.; Sica, G.; Scicchitano, B.M. Pathological and Molecular Features of Glioblastoma and Its Peritumoral Tissue. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11040469.
 21. Lee, K.S.; Choe, G.; Nam, K.H.; Seo, A.N.; Yun, S.; Kim, K.J.; Cho, H.J.; Park, S.H. Immunohistochemical classification of primary and secondary glioblastomas. *Korean J Pathol* **2013**, *47*, 541-548, doi:10.4132/KoreanJPathol.2013.47.6.541.
 22. Stupp, R.; Mason, W.P.; van den Bent, M.J.; Weller, M.; Fisher, B.; Taphoorn, M.J.; Belanger, K.; Brandes, A.A.; Marosi, C.; Bogdahn, U., et al. Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 987-996, doi:10.1056/NEJMoa043330.
 23. Zhang, H.; Wang, R.; Yu, Y.; Liu, J.; Luo, T.; Fan, F. Glioblastoma Treatment Modalities besides Surgery. *J Cancer* **2019**, *10*, 4793-4806, doi:10.7150/jca.32475.
 24. Pessina, F.; Navarra, P.; Cozzi, L.; Tomatis, S.; Riva, M.; Ascolese, A.M.; Santoro, A.; Simonelli, M.; Bello, L.; Scorsetti, M. Role of surgical resection in recurrent glioblastoma: prognostic factors and outcome evaluation in an observational study. *J Neurooncol* **2017**, *131*, 377-384, doi:10.1007/s11060-016-2310-y.
 25. Lee, S.Y. Temozolomide resistance in glioblastoma multiforme. *Genes Dis* **2016**, *3*, 198-210, doi:10.1016/j.gendis.2016.04.007.
 26. Singh, N.; Miner, A.; Hennis, L.; Mittal, S. Mechanisms of temozolomide resistance in glioblastoma - a comprehensive review. *Cancer Drug Resist* **2021**, *4*, 17-43, doi:10.20517/cdr.2020.79.
 27. Bausart, M.; Preat, V.; Malfanti, A. Immunotherapy for glioblastoma: the promise of combination strategies. *J Exp Clin Cancer Res* **2022**, *41*, 35, doi:10.1186/s13046-022-02251-2.
 28. Medikonda, R.; Dunn, G.; Rahman, M.; Fecci, P.; Lim, M. A review of glioblastoma immunotherapy. *J Neurooncol* **2021**, *151*, 41-53, doi:10.1007/s11060-020-03448-1.
 29. Guberina, N.; Pottgen, C.; Kebir, S.; Lazaridis, L.; Scharmberg, C.; Lubcke, W.; Niessen, M.; Guberina, M.; Scheffler, B.; Jendrossek, V., et al. Combined radiotherapy and concurrent tumor treating fields (TTFields) for glioblastoma: Dosimetric consequences on non-coplanar IMRT as initial results from a phase I trial. *Radiat Oncol* **2020**, *15*, 83, doi:10.1186/s13014-020-01521-7.
 30. Tanzhu, G.; Chen, L.; Xiao, G.; Shi, W.; Peng, H.; Chen, D.; Zhou, R. The schemes, mechanisms and molecular pathway changes of Tumor Treating Fields (TTFields) alone or in combination with radiotherapy and chemotherapy. *Cell Death Discov* **2022**, *8*, 416, doi:10.1038/s41420-022-01206-y.
 31. Han, S.; Liu, Y.; Cai, S.J.; Qian, M.; Ding, J.; Larion, M.; Gilbert, M.R.; Yang, C. IDH mutation in glioma: molecular mechanisms and potential therapeutic targets. *Br J Cancer* **2020**, *122*, 1580-1589, doi:10.1038/s41416-020-0814-x.
 32. Yan, H.; Parsons, D.W.; Jin, G.; McLendon, R.; Rasheed, B.A.; Yuan, W.; Kos, I.; Batinic-Haberle, I.; Jones, S.; Riggins, G.J., et al. IDH1 and IDH2 mutations in gliomas. *N Engl J Med* **2009**, *360*, 765-773, doi:10.1056/NEJMoa0808710.
 33. Chaurasia, A.; Park, S.H.; Seo, J.W.; Park, C.K. Immunohistochemical Analysis of ATRX, IDH1 and p53 in Glioblastoma and Their Correlations with Patient Survival. *J Korean Med Sci* **2016**, *31*, 1208-1214, doi:10.3346/jkms.2016.31.8.1208.
 34. Killela, P.J.; Reitman, Z.J.; Jiao, Y.; Bettegowda, C.; Agrawal, N.; Diaz, L.A., Jr.; Friedman, A.H.; Friedman, H.; Gallia, G.L.; Giovanella, B.C., et al. TERT promoter mutations occur frequently in gliomas and a subset of tumors derived from cells with low rates of self-renewal. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2013**, *110*, 6021-6026, doi:10.1073/pnas.1303607110.
 35. Djuzenova, C.S.; Fiedler, V.; Memmel, S.; Katzer, A.; Hartmann, S.; Krohne, G.; Zimmermann, H.; Scholz, C.J.; Polat, B.; Flentje, M., et al. Actin cytoskeleton organization,

- cell surface modification and invasion rate of 5 glioblastoma cell lines differing in PTEN and p53 status. *Exp Cell Res* **2015**, *330*, 346-357, doi:10.1016/j.yexcr.2014.08.013.
36. Behling, F.; Barrantes-Freer, A.; Skardelly, M.; Nieser, M.; Christians, A.; Stockhammer, F.; Rohde, V.; Tatagiba, M.; Hartmann, C.; Stadelmann, C., et al. Frequency of BRAF V600E mutations in 969 central nervous system neoplasms. *Diagn Pathol* **2016**, *11*, 55, doi:10.1186/s13000-016-0506-2.
 37. Di Nunno, V.; Gatto, L.; Tosoni, A.; Bartolini, S.; Franceschi, E. Implications of BRAF V600E mutation in gliomas: Molecular considerations, prognostic value and treatment evolution. *Front Oncol* **2022**, *12*, 1067252, doi:10.3389/fonc.2022.1067252.
 38. Agnihotri, S.; Wolf, A.; Munoz, D.M.; Smith, C.J.; Gajadhar, A.; Restrepo, A.; Clarke, I.D.; Fuller, G.N.; Kesari, S.; Dirks, P.B., et al. A GATA4-regulated tumor suppressor network represses formation of malignant human astrocytomas. *J Exp Med* **2011**, *208*, 689-702, doi:10.1084/jem.20102099.
 39. Trabska-Kluch, B.; Braun, M.; Orzechowska, M.; Paszek, S.; Zuchowska, A.; Solek, J.; Kluska, A.; Fijuth, J.; Jesionek-Kupnicka, D.; Zawlik, I. Potential Prognostic Value of GATA4 Depends on the p53 Expression in Primary Glioblastoma Patients. *Genes (Basel)* **2023**, *14*, doi:10.3390/genes14061146.
 40. Gouaze-Andersson, V.; Delmas, C.; Taurand, M.; Martinez-Gala, J.; Evrard, S.; Mazoyer, S.; Toulas, C.; Cohen-Jonathan-Moyal, E. FGFR1 Induces Glioblastoma Radioresistance through the PLCgamma/Hif1alpha Pathway. *Cancer Res* **2016**, *76*, 3036-3044, doi:10.1158/0008-5472.CAN-15-2058.
 41. Kowalski-Chauvel, A.; Gouaze-Andersson, V.; Baricault, L.; Martin, E.; Delmas, C.; Toulas, C.; Cohen-Jonathan-Moyal, E.; Seva, C. Alpha6-Integrin Regulates FGFR1 Expression through the ZEB1/YAP1 Transcription Complex in Glioblastoma Stem Cells Resulting in Enhanced Proliferation and Stemness. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11030406.
 42. Heimberger, A.B.; Suki, D.; Yang, D.; Shi, W.; Aldape, K. The natural history of EGFR and EGFRvIII in glioblastoma patients. *J Transl Med* **2005**, *3*, 38, doi:10.1186/1479-5876-3-38.
 43. Xu, H.; Zong, H.; Ma, C.; Ming, X.; Shang, M.; Li, K.; He, X.; Du, H.; Cao, L. Epidermal growth factor receptor in glioblastoma. *Oncol Lett* **2017**, *14*, 512-516, doi:10.3892/ol.2017.6221.
 44. Oprita, A.; Baloi, S.C.; Staicu, G.A.; Alexandru, O.; Tache, D.E.; Danoiu, S.; Micu, E.S.; Sevastre, A.S. Updated Insights on EGFR Signaling Pathways in Glioma. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22020587.
 45. Kanzawa, T.; Bedwell, J.; Kondo, Y.; Kondo, S.; Germano, I.M. Inhibition of DNA repair for sensitizing resistant glioma cells to temozolomide. *J Neurosurg* **2003**, *99*, 1047-1052, doi:10.3171/jns.2003.99.6.1047.
 46. Hegi, M.E.; Diserens, A.C.; Gorlia, T.; Hamou, M.F.; de Tribolet, N.; Weller, M.; Kros, J.M.; Hainfellner, J.A.; Mason, W.; Mariani, L., et al. MGMT gene silencing and benefit from temozolomide in glioblastoma. *N Engl J Med* **2005**, *352*, 997-1003, doi:10.1056/NEJMoa043331.
 47. Clark, A.J.; Ware, J.L.; Chen, M.Y.; Graf, M.R.; Van Meter, T.E.; Dos Santos, W.G.; Fillmore, H.L.; Broaddus, W.C. Effect of WT1 gene silencing on the tumorigenicity of human glioblastoma multiforme cells. *J Neurosurg* **2010**, *112*, 18-25, doi:10.3171/2008.11.JNS08368.
 48. Koul, D. PTEN signaling pathways in glioblastoma. *Cancer Biol Ther* **2008**, *7*, 1321-1325, doi:10.4161/cbt.7.9.6954.
 49. Knobbe, C.B.; Merlo, A.; Reifenberger, G. Pten signaling in gliomas. *Neuro Oncol* **2002**, *4*, 196-211.
 50. Hoadley, K.A.; Yau, C.; Hinoue, T.; Wolf, D.M.; Lazar, A.J.; Drill, E.; Shen, R.; Taylor, A.M.; Cherniack, A.D.; Thorsson, V., et al. Cell-of-Origin Patterns Dominate the Molecular Classification of 10,000 Tumors from 33 Types of Cancer. *Cell* **2018**, *173*, 291-304 e296, doi:10.1016/j.cell.2018.03.022.

51. Brennan, C.W.; Verhaak, R.G.; McKenna, A.; Campos, B.; Nounshmehr, H.; Salama, S.R.; Zheng, S.; Chakravarty, D.; Sanborn, J.Z.; Berman, S.H., et al. The somatic genomic landscape of glioblastoma. *Cell* **2013**, *155*, 462-477, doi:10.1016/j.cell.2013.09.034.
52. Godlewski, J.; Ferrer-Luna, R.; Rooj, A.K.; Mineo, M.; Ricklefs, F.; Takeda, Y.S.; Nowicki, M.O.; Salinska, E.; Nakano, I.; Lee, H., et al. MicroRNA Signatures and Molecular Subtypes of Glioblastoma: The Role of Extracellular Transfer. *Stem Cell Reports* **2017**, *8*, 1497-1505, doi:10.1016/j.stemcr.2017.04.024.
53. Stackhouse, C.T.; Gillespie, G.Y.; Willey, C.D. Exploring the Roles of lncRNAs in GBM Pathophysiology and Their Therapeutic Potential. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9112369.
54. Najafi, M.; Farhood, B.; Mortezaee, K. Cancer stem cells (CSCs) in cancer progression and therapy. *J Cell Physiol* **2019**, *234*, 8381-8395, doi:10.1002/jcp.27740.
55. Aponte, P.M.; Caicedo, A. Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment. *Stem Cells Int* **2017**, *2017*, 5619472, doi:10.1155/2017/5619472.
56. Eid, R.A.; Alaa Edeen, M.; Shedid, E.M.; Kamal, A.S.S.; Warda, M.M.; Mamdouh, F.; Khedr, S.A.; Soltan, M.A.; Jeon, H.W.; Zaki, M.S.A., et al. Targeting Cancer Stem Cells as the Key Driver of Carcinogenesis and Therapeutic Resistance. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24021786.
57. Tang, X.; Zuo, C.; Fang, P.; Liu, G.; Qiu, Y.; Huang, Y.; Tang, R. Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy. *Front Oncol* **2021**, *11*, 701291, doi:10.3389/fonc.2021.701291.
58. Singh, S.K.; Hawkins, C.; Clarke, I.D.; Squire, J.A.; Bayani, J.; Hide, T.; Henkelman, R.M.; Cusimano, M.D.; Dirks, P.B. Identification of human brain tumour initiating cells. *Nature* **2004**, *432*, 396-401, doi:10.1038/nature03128.
59. Brescia, P.; Ortensi, B.; Fornasari, L.; Levi, D.; Broggi, G.; Pelicci, G. CD133 is essential for glioblastoma stem cell maintenance. *Stem Cells* **2013**, *31*, 857-869, doi:10.1002/stem.1317.
60. Colwell, N.; Larion, M.; Giles, A.J.; Seldomridge, A.N.; Sizzdahkhani, S.; Gilbert, M.R.; Park, D.M. Hypoxia in the glioblastoma microenvironment: shaping the phenotype of cancer stem-like cells. *Neuro Oncol* **2017**, *19*, 887-896, doi:10.1093/neuonc/now258.
61. Papale, M.; Buccarelli, M.; Mollinari, C.; Russo, M.A.; Pallini, R.; Ricci-Vitiani, L.; Tafani, M. Hypoxia, Inflammation and Necrosis as Determinants of Glioblastoma Cancer Stem Cells Progression. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21082660.
62. Auffinger, B.; Spencer, D.; Pytel, P.; Ahmed, A.U.; Lesniak, M.S. The role of glioma stem cells in chemotherapy resistance and glioblastoma multiforme recurrence. *Expert Rev Neurother* **2015**, *15*, 741-752, doi:10.1586/14737175.2015.1051968.
63. Kim, D.H.; Xing, T.; Yang, Z.; Dudek, R.; Lu, Q.; Chen, Y.H. Epithelial Mesenchymal Transition in Embryonic Development, Tissue Repair and Cancer: A Comprehensive Overview. *J Clin Med* **2017**, *7*, doi:10.3390/jcm7010001.
64. Ribatti, D.; Tamma, R.; Annese, T. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. *Transl Oncol* **2020**, *13*, 100773, doi:10.1016/j.tranon.2020.100773.
65. Dongre, A.; Weinberg, R.A. New insights into the mechanisms of epithelial-mesenchymal transition and implications for cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2019**, *20*, 69-84, doi:10.1038/s41580-018-0080-4.
66. Iwadate, Y. Epithelial-mesenchymal transition in glioblastoma progression. *Oncol Lett* **2016**, *11*, 1615-1620, doi:10.3892/ol.2016.4113.
67. Iser, I.C.; Lenz, G.; Wink, M.R. EMT-like process in glioblastomas and reactive astrocytes. *Neurochem Int* **2019**, *122*, 139-143, doi:10.1016/j.neuint.2018.11.016.
68. Bajetto, A.; Thellung, S.; Dellacasagrande, I.; Pagano, A.; Barbieri, F.; Florio, T. Cross talk between mesenchymal and glioblastoma stem cells: Communication beyond controversies. *Stem Cells Transl Med* **2020**, *9*, 1310-1330, doi:10.1002/sctm.20-0161.
69. Fantozzi, A.; Gruber, D.C.; Pisarsky, L.; Heck, C.; Kunita, A.; Yilmaz, M.; Meyer-Schaller, N.; Cornille, K.; Hopfer, U.; Bentires-Alj, M., et al. VEGF-mediated angiogenesis links EMT-induced cancer stemness to tumor initiation. *Cancer Res* **2014**, *74*, 1566-1575, doi:10.1158/0008-5472.CAN-13-1641.

70. Li, G.C.; Zhang, H.W.; Zhao, Q.C.; Sun, L.I.; Yang, J.J.; Hong, L.; Feng, F.; Cai, L. Mesenchymal stem cells promote tumor angiogenesis via the action of transforming growth factor beta1. *Oncol Lett* **2016**, *11*, 1089-1094, doi:10.3892/ol.2015.3997.
71. Wu, B.; Zhu, J.; Dai, X.; Ye, L.; Wang, B.; Cheng, H.; Wang, W. Raddeanin A inhibited epithelial-mesenchymal transition (EMT) and angiogenesis in glioblastoma by downregulating beta-catenin expression. *Int J Med Sci* **2021**, *18*, 1609-1617, doi:10.7150/ijms.52206.
72. Kast, R.E.; Skuli, N.; Karpel-Massler, G.; Frosina, G.; Ryken, T.; Halatsch, M.E. Blocking epithelial-to-mesenchymal transition in glioblastoma with a sextet of repurposed drugs: the EIS regimen. *Oncotarget* **2017**, *8*, 60727-60749, doi:10.18632/oncotarget.18337.
73. Song, Y.; Chen, Y.; Li, Y.; Lyu, X.; Cui, J.; Cheng, Y.; Zheng, T.; Zhao, L.; Zhao, G. Resveratrol Suppresses Epithelial-Mesenchymal Transition in GBM by Regulating Smad-Dependent Signaling. *Biomed Res Int* **2019**, *2019*, 1321973, doi:10.1155/2019/1321973.
74. Baghban, R.; Roshangar, L.; Jahanban-Esfahlan, R.; Seidi, K.; Ebrahimi-Kalan, A.; Jaymand, M.; Kolahian, S.; Javaheri, T.; Zare, P. Tumor microenvironment complexity and therapeutic implications at a glance. *Cell Commun Signal* **2020**, *18*, 59, doi:10.1186/s12964-020-0530-4.
75. Brassart-Pasco, S.; Brezillon, S.; Brassart, B.; Ramont, L.; Oudart, J.B.; Monboisse, J.C. Tumor Microenvironment: Extracellular Matrix Alterations Influence Tumor Progression. *Front Oncol* **2020**, *10*, 397, doi:10.3389/fonc.2020.00397.
76. Mohiuddin, E.; Wakimoto, H. Extracellular matrix in glioblastoma: opportunities for emerging therapeutic approaches. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 3742-3754.
77. Grasset, E.M.; Bertero, T.; Bozec, A.; Friard, J.; Bourget, I.; Pisano, S.; Lecacheur, M.; Maiel, M.; Bailleux, C.; Emelyanov, A., et al. Matrix Stiffening and EGFR Cooperate to Promote the Collective Invasion of Cancer Cells. *Cancer Res* **2018**, *78*, 5229-5242, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-0601.
78. Ferrer, V.P.; Moura Neto, V.; Mentlein, R. Glioma infiltration and extracellular matrix: key players and modulators. *Glia* **2018**, *66*, 1542-1565, doi:10.1002/glia.23309.
79. Virtuoso, A.; Giovannoni, R.; De Luca, C.; Gargano, F.; Cerasuolo, M.; Maggio, N.; Lavitrano, M.; Papa, M. The Glioblastoma Microenvironment: Morphology, Metabolism, and Molecular Signature of Glial Dynamics to Discover Metabolic Rewiring Sequence. *Int J Mol Sci* **2021**, *22*, doi:10.3390/ijms22073301.
80. Warburg, O.; Wind, F.; Negelein, E. The Metabolism of Tumors in the Body. *J Gen Physiol* **1927**, *8*, 519-530, doi:10.1085/jgp.8.6.519.
81. Hagemann, C.; Anacker, J.; Ernestus, R.I.; Vince, G.H. A complete compilation of matrix metalloproteinase expression in human malignant gliomas. *World J Clin Oncol* **2012**, *3*, 67-79, doi:10.5306/wjco.v3.i5.67.
82. Broekman, M.L.; Maas, S.L.N.; Abels, E.R.; Mempel, T.R.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Multidimensional communication in the microenvirons of glioblastoma. *Nat Rev Neurol* **2018**, *14*, 482-495, doi:10.1038/s41582-018-0025-8.
83. Yanez-Mo, M.; Siljander, P.R.; Andreu, Z.; Zavec, A.B.; Borrás, F.E.; Buzas, E.I.; Buzas, K.; Casal, E.; Cappello, F.; Carvalho, J., et al. Biological properties of extracellular vesicles and their physiological functions. *J Extracell Vesicles* **2015**, *4*, 27066, doi:10.3402/jev.v4.27066.
84. Zappulli, V.; Friis, K.P.; Fitzpatrick, Z.; Maguire, C.A.; Breakefield, X.O. Extracellular vesicles and intercellular communication within the nervous system. *J Clin Invest* **2016**, *126*, 1198-1207, doi:10.1172/JCI81134.
85. D'Asti, E.; Chennakrishnaiah, S.; Lee, T.H.; Rak, J. Extracellular Vesicles in Brain Tumor Progression. *Cell Mol Neurobiol* **2016**, *36*, 383-407, doi:10.1007/s10571-015-0296-1.
86. Jaiswal, R.; Sedger, L.M. Intercellular Vesicular Transfer by Exosomes, Microparticles and Oncosomes - Implications for Cancer Biology and Treatments. *Front Oncol* **2019**, *9*, 125, doi:10.3389/fonc.2019.00125.
87. Mulcahy, L.A.; Pink, R.C.; Carter, D.R. Routes and mechanisms of extracellular vesicle uptake. *J Extracell Vesicles* **2014**, *3*, doi:10.3402/jev.v3.24641.
88. Camussi, G.; Deregiibus, M.C.; Tetta, C. Tumor-derived microvesicles and the cancer microenvironment. *Curr Mol Med* **2013**, *13*, 58-67.
89. Skog, J.; Wurdinger, T.; van Rijn, S.; Meijer, D.H.; Gainche, L.; Sena-Esteves, M.; Curry, W.T., Jr.; Carter, B.S.; Krichevsky, A.M.; Breakefield, X.O. Glioblastoma microvesicles

- transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers. *Nat Cell Biol* **2008**, *10*, 1470-1476, doi:10.1038/ncb1800.
90. Li, C.C.; Eaton, S.A.; Young, P.E.; Lee, M.; Shuttleworth, R.; Humphreys, D.T.; Grau, G.E.; Combes, V.; Bebawy, M.; Gong, J., et al. Glioma microvesicles carry selectively packaged coding and non-coding RNAs which alter gene expression in recipient cells. *RNA Biol* **2013**, *10*, 1333-1344, doi:10.4161/rna.25281.
 91. Wei, Z.; Batagov, A.O.; Schinelli, S.; Wang, J.; Wang, Y.; El Fatimy, R.; Rabinovsky, R.; Balaj, L.; Chen, C.C.; Hochberg, F., et al. Coding and noncoding landscape of extracellular RNA released by human glioma stem cells. *Nat Commun* **2017**, *8*, 1145, doi:10.1038/s41467-017-01196-x.
 92. de Vrij, J.; Maas, S.L.; Kwappenberg, K.M.; Schnoor, R.; Kleijn, A.; Dekker, L.; Luider, T.M.; de Witte, L.D.; Litjens, M.; van Strien, M.E., et al. Glioblastoma-derived extracellular vesicles modify the phenotype of monocytic cells. *Int J Cancer* **2015**, *137*, 1630-1642, doi:10.1002/ijc.29521.
 93. Rajan, A.; Zhao, C. Deciphering the biology of thymic epithelial tumors. *Mediastinum* **2019**, *3*, doi:10.21037/med.2019.08.03.
 94. Gabrusiewicz, K.; Li, X.; Wei, J.; Hashimoto, Y.; Marisetty, A.L.; Ott, M.; Wang, F.; Hawke, D.; Yu, J.; Healy, L.M., et al. Glioblastoma stem cell-derived exosomes induce M2 macrophages and PD-L1 expression on human monocytes. *Oncoimmunology* **2018**, *7*, e1412909, doi:10.1080/2162402X.2017.1412909.
 95. Banks, W.A.; Sharma, P.; Bullock, K.M.; Hansen, K.M.; Ludwig, N.; Whiteside, T.L. Transport of Extracellular Vesicles across the Blood-Brain Barrier: Brain Pharmacokinetics and Effects of Inflammation. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21124407.
 96. Ramos-Zaldivar, H.M.; Polakovicova, I.; Salas-Huenuleo, E.; Corvalan, A.H.; Kogan, M.J.; Yefi, C.P.; Andia, M.E. Extracellular vesicles through the blood-brain barrier: a review. *Fluids Barriers CNS* **2022**, *19*, 60, doi:10.1186/s12987-022-00359-3.
 97. Wang, X.; Yu, X.; Xu, H.; Wei, K.; Wang, S.; Wang, Y.; Han, J. Serum-derived extracellular vesicles facilitate temozolomide resistance in glioblastoma through a HOTAIR-dependent mechanism. *Cell Death Dis* **2022**, *13*, 344, doi:10.1038/s41419-022-04699-8.
 98. Tzaridis, T.; Weller, J.; Bachurski, D.; Shakeri, F.; Schaub, C.; Hau, P.; Buness, A.; Schlegel, U.; Steinbach, J.P.; Seidel, C., et al. A novel serum extracellular vesicle protein signature to monitor glioblastoma tumor progression. *Int J Cancer* **2023**, *152*, 308-319, doi:10.1002/ijc.34261.
 99. Mattick, J.S.; Makunin, I.V. Non-coding RNA. *Hum Mol Genet* **2006**, *15 Spec No 1*, R17-29, doi:10.1093/hmg/ddl046.
 100. Jiang, M.C.; Ni, J.J.; Cui, W.Y.; Wang, B.Y.; Zhuo, W. Emerging roles of lncRNA in cancer and therapeutic opportunities. *Am J Cancer Res* **2019**, *9*, 1354-1366.
 101. Peng, Y.; Croce, C.M. The role of MicroRNAs in human cancer. *Signal Transduct Target Ther* **2016**, *1*, 15004, doi:10.1038/sigtrans.2015.4.
 102. Abel, Y.; Rederstorff, M. SnoRNAs and the emerging class of sdRNAs: Multifaceted players in oncogenesis. *Biochimie* **2019**, *164*, 17-21, doi:10.1016/j.biochi.2019.05.006.
 103. Wu, X.; Pan, Y.; Fang, Y.; Zhang, J.; Xie, M.; Yang, F.; Yu, T.; Ma, P.; Li, W.; Shu, Y. The Biogenesis and Functions of piRNAs in Human Diseases. *Mol Ther Nucleic Acids* **2020**, *21*, 108-120, doi:10.1016/j.omtn.2020.05.023.
 104. Patop, I.L.; Wust, S.; Kadener, S. Past, present, and future of circRNAs. *EMBO J* **2019**, *38*, e100836, doi:10.15252/embj.2018100836.
 105. Haque, S.; Harries, L.W. Circular RNAs (circRNAs) in Health and Disease. *Genes (Basel)* **2017**, *8*, doi:10.3390/genes8120353.
 106. Pandey, P.R.; Rout, P.K.; Das, A.; Gorospe, M.; Panda, A.C. RPAD (RNase R treatment, polyadenylation, and poly(A)+ RNA depletion) method to isolate highly pure circular RNA. *Methods* **2019**, *155*, 41-48, doi:10.1016/j.ymeth.2018.10.022.
 107. Enuka, Y.; Lauriola, M.; Feldman, M.E.; Sas-Chen, A.; Ulitsky, I.; Yarden, Y. Circular RNAs are long-lived and display only minimal early alterations in response to a growth factor. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 1370-1383, doi:10.1093/nar/gkv1367.

108. Zhou, Q.; Ju, L.L.; Ji, X.; Cao, Y.L.; Shao, J.G.; Chen, L. Plasma circRNAs as Biomarkers in Cancer. *Cancer Manag Res* **2021**, *13*, 7325-7337, doi:10.2147/CMAR.S330228.
109. Sanger, H.L.; Klotz, G.; Riesner, D.; Gross, H.J.; Kleinschmidt, A.K. Viroids are single-stranded covalently closed circular RNA molecules existing as highly base-paired rod-like structures. *Proc Natl Acad Sci U S A* **1976**, *73*, 3852-3856, doi:10.1073/pnas.73.11.3852.
110. Hsu, M.T.; Coca-Prados, M. Electron microscopic evidence for the circular form of RNA in the cytoplasm of eukaryotic cells. *Nature* **1979**, *280*, 339-340, doi:10.1038/280339a0.
111. Nigro, J.M.; Cho, K.R.; Fearon, E.R.; Kern, S.E.; Ruppert, J.M.; Oliner, J.D.; Kinzler, K.W.; Vogelstein, B. Scrambled exons. *Cell* **1991**, *64*, 607-613, doi:10.1016/0092-8674(91)90244-s.
112. Jeck, W.R.; Sorrentino, J.A.; Wang, K.; Slevin, M.K.; Burd, C.E.; Liu, J.; Marzluff, W.F.; Sharpless, N.E. Circular RNAs are abundant, conserved, and associated with ALU repeats. *RNA* **2013**, *19*, 141-157, doi:10.1261/rna.035667.112.
113. Memczak, S.; Jens, M.; Elefsinioti, A.; Torti, F.; Krueger, J.; Rybak, A.; Maier, L.; Mackowiak, S.D.; Gregersen, L.H.; Munschauer, M., et al. Circular RNAs are a large class of animal RNAs with regulatory potency. *Nature* **2013**, *495*, 333-338, doi:10.1038/nature11928.
114. Ghosal, S.; Das, S.; Sen, R.; Basak, P.; Chakrabarti, J. Circ2Traits: a comprehensive database for circular RNA potentially associated with disease and traits. *Front Genet* **2013**, *4*, 283, doi:10.3389/fgene.2013.00283.
115. Wang, P.L.; Bao, Y.; Yee, M.C.; Barrett, S.P.; Hogan, G.J.; Olsen, M.N.; Dinneny, J.R.; Brown, P.O.; Salzman, J. Circular RNA is expressed across the eukaryotic tree of life. *PLoS One* **2014**, *9*, e90859, doi:10.1371/journal.pone.0090859.
116. Hanan, M.; Soreq, H.; Kadener, S. CircRNAs in the brain. *RNA Biol* **2017**, *14*, 1028-1034, doi:10.1080/15476286.2016.1255398.
117. Rybak-Wolf, A.; Stottmeister, C.; Glazar, P.; Jens, M.; Pino, N.; Giusti, S.; Hanan, M.; Behm, M.; Bartok, O.; Ashwal-Fluss, R., et al. Circular RNAs in the Mammalian Brain Are Highly Abundant, Conserved, and Dynamically Expressed. *Mol Cell* **2015**, *58*, 870-885, doi:10.1016/j.molcel.2015.03.027.
118. Glazar, P.; Papavasileiou, P.; Rajewsky, N. circBase: a database for circular RNAs. *RNA* **2014**, *20*, 1666-1670, doi:10.1261/rna.043687.113.
119. Zhang, X.O.; Dong, R.; Zhang, Y.; Zhang, J.L.; Luo, Z.; Zhang, J.; Chen, L.L.; Yang, L. Diverse alternative back-splicing and alternative splicing landscape of circular RNAs. *Genome Res* **2016**, *26*, 1277-1287, doi:10.1101/gr.202895.115.
120. Dudekula, D.B.; Panda, A.C.; Grammatikakis, I.; De, S.; Abdelmohsen, K.; Gorospe, M. CircInteractome: A web tool for exploring circular RNAs and their interacting proteins and microRNAs. *RNA Biol* **2016**, *13*, 34-42, doi:10.1080/15476286.2015.1128065.
121. Starke, S.; Jost, I.; Rossbach, O.; Schneider, T.; Schreiner, S.; Hung, L.H.; Bindereif, A. Exon circularization requires canonical splice signals. *Cell Rep* **2015**, *10*, 103-111, doi:10.1016/j.celrep.2014.12.002.
122. Chen, L.L.; Yang, L. Regulation of circRNA biogenesis. *RNA Biol* **2015**, *12*, 381-388, doi:10.1080/15476286.2015.1020271.
123. Conn, S.J.; Pillman, K.A.; Toubia, J.; Conn, V.M.; Salmanidis, M.; Phillips, C.A.; Roslan, S.; Schreiber, A.W.; Gregory, P.A.; Goodall, G.J. The RNA binding protein quaking regulates formation of circRNAs. *Cell* **2015**, *160*, 1125-1134, doi:10.1016/j.cell.2015.02.014.
124. Ashwal-Fluss, R.; Meyer, M.; Pamudurti, N.R.; Ivanov, A.; Bartok, O.; Hanan, M.; Evantal, N.; Memczak, S.; Rajewsky, N.; Kadener, S. circRNA biogenesis competes with pre-mRNA splicing. *Mol Cell* **2014**, *56*, 55-66, doi:10.1016/j.molcel.2014.08.019.
125. Shen, H.; An, O.; Ren, X.; Song, Y.; Tang, S.J.; Ke, X.Y.; Han, J.; Tay, D.J.T.; Ng, V.H.E.; Molias, F.B., et al. ADARs act as potent regulators of circular transcriptome in cancer. *Nat Commun* **2022**, *13*, 1508, doi:10.1038/s41467-022-29138-2.
126. Errichelli, L.; Dini Modigliani, S.; Laneve, P.; Colantoni, A.; Legnini, I.; Caputo, D.; Rosa, A.; De Santis, R.; Scarfo, R.; Peruzzi, G., et al. FUS affects circular RNA expression in murine embryonic stem cell-derived motor neurons. *Nat Commun* **2017**, *8*, 14741, doi:10.1038/ncomms14741.

127. Colantoni, A.; Capauto, D.; Alfano, V.; D'Ambra, E.; D'Uva, S.; Tartaglia, G.G.; Morlando, M. FUS Alters circRNA Metabolism in Human Motor Neurons Carrying the ALS-Linked P525L Mutation. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24043181.
128. Zhang, X.O.; Wang, H.B.; Zhang, Y.; Lu, X.; Chen, L.L.; Yang, L. Complementary sequence-mediated exon circularization. *Cell* **2014**, *159*, 134-147, doi:10.1016/j.cell.2014.09.001.
129. Wilusz, J.E. Repetitive elements regulate circular RNA biogenesis. *Mob Genet Elements* **2015**, *5*, 1-7, doi:10.1080/2159256X.2015.1045682.
130. Zhang, Y.; Zhang, X.O.; Chen, T.; Xiang, J.F.; Yin, Q.F.; Xing, Y.H.; Zhu, S.; Yang, L.; Chen, L.L. Circular intronic long noncoding RNAs. *Mol Cell* **2013**, *51*, 792-806, doi:10.1016/j.molcel.2013.08.017.
131. Barrett, S.P.; Wang, P.L.; Salzman, J. Circular RNA biogenesis can proceed through an exon-containing lariat precursor. *Elife* **2015**, *4*, e07540, doi:10.7554/eLife.07540.
132. Zhou, W.Y.; Cai, Z.R.; Liu, J.; Wang, D.S.; Ju, H.Q.; Xu, R.H. Circular RNA: metabolism, functions and interactions with proteins. *Mol Cancer* **2020**, *19*, 172, doi:10.1186/s12943-020-01286-3.
133. Li, Z.; Kearse, M.G.; Huang, C. The nuclear export of circular RNAs is primarily defined by their length. *RNA Biol* **2019**, *16*, 1-4, doi:10.1080/15476286.2018.1557498.
134. Zhang, J.; Zhang, X.; Li, C.; Yue, L.; Ding, N.; Riordan, T.; Yang, L.; Li, Y.; Jen, C.; Lin, S., et al. Circular RNA profiling provides insights into their subcellular distribution and molecular characteristics in HepG2 cells. *RNA Biol* **2019**, *16*, 220-232, doi:10.1080/15476286.2019.1565284.
135. Zhao, Q.; Liu, J.; Deng, H.; Ma, R.; Liao, J.Y.; Liang, H.; Hu, J.; Li, J.; Guo, Z.; Cai, J., et al. Targeting Mitochondria-Located circRNA SCAR Alleviates NASH via Reducing mROS Output. *Cell* **2020**, *183*, 76-93 e22, doi:10.1016/j.cell.2020.08.009.
136. Liao, X.; Li, X.J.; Zheng, G.T.; Chang, F.R.; Fang, L.; Yu, H.; Huang, J.; Zhang, Y.F. Mitochondrion-encoded circular RNAs are widespread and translatable in plants. *Plant Physiol* **2022**, *189*, 1482-1500, doi:10.1093/plphys/kiac143.
137. Li, Y.; Zheng, Q.; Bao, C.; Li, S.; Guo, W.; Zhao, J.; Chen, D.; Gu, J.; He, X.; Huang, S. Circular RNA is enriched and stable in exosomes: a promising biomarker for cancer diagnosis. *Cell Res* **2015**, *25*, 981-984, doi:10.1038/cr.2015.82.
138. Jeck, W.R.; Sharpless, N.E. Detecting and characterizing circular RNAs. *Nat Biotechnol* **2014**, *32*, 453-461, doi:10.1038/nbt.2890.
139. Li, X.; Zhang, J.L.; Lei, Y.N.; Liu, X.Q.; Xue, W.; Zhang, Y.; Nan, F.; Gao, X.; Zhang, J.; Wei, J., et al. Linking circular intronic RNA degradation and function in transcription by RNase H1. *Sci China Life Sci* **2021**, *64*, 1795-1809, doi:10.1007/s11427-021-1993-6.
140. Jia, R.; Xiao, M.S.; Li, Z.; Shan, G.; Huang, C. Defining an evolutionarily conserved role of GW182 in circular RNA degradation. *Cell Discov* **2019**, *5*, 45, doi:10.1038/s41421-019-0113-y.
141. Pan, Z.; Li, G.F.; Sun, M.L.; Xie, L.; Liu, D.; Zhang, Q.; Yang, X.X.; Xia, S.; Liu, X.; Zhou, H., et al. MicroRNA-1224 Splicing CircularRNA-Filip1l in an Ago2-Dependent Manner Regulates Chronic Inflammatory Pain via Targeting Ubr5. *J Neurosci* **2019**, *39*, 2125-2143, doi:10.1523/JNEUROSCI.1631-18.2018.
142. Park, O.H.; Ha, H.; Lee, Y.; Boo, S.H.; Kwon, D.H.; Song, H.K.; Kim, Y.K. Endoribonucleolytic Cleavage of m(6)A-Containing RNAs by RNase P/MRP Complex. *Mol Cell* **2019**, *74*, 494-507 e498, doi:10.1016/j.molcel.2019.02.034.
143. Zhang, L.; Hou, C.; Chen, C.; Guo, Y.; Yuan, W.; Yin, D.; Liu, J.; Sun, Z. The role of N(6)-methyladenosine (m(6)A) modification in the regulation of circRNAs. *Mol Cancer* **2020**, *19*, 105, doi:10.1186/s12943-020-01224-3.
144. Guo, Y.; Zhu, X.; Zeng, M.; Qi, L.; Tang, X.; Wang, D.; Zhang, M.; Xie, Y.; Li, H.; Yang, X., et al. A diet high in sugar and fat influences neurotransmitter metabolism and then affects brain function by altering the gut microbiota. *Transl Psychiatry* **2021**, *11*, 328, doi:10.1038/s41398-021-01443-2.
145. Li, H.M.; Ma, X.L.; Li, H.G. Intriguing circles: Conflicts and controversies in circular RNA research. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **2019**, *10*, e1538, doi:10.1002/wrna.1538.

146. Gu, A.; Jaijyan, D.K.; Yang, S.; Zeng, M.; Pei, S.; Zhu, H. Functions of Circular RNA in Human Diseases and Illnesses. *Noncoding RNA* **2023**, *9*, doi:10.3390/ncrna9040038.
147. Zhao, X.; Cai, Y.; Xu, J. Circular RNAs: Biogenesis, Mechanism, and Function in Human Cancers. *Int J Mol Sci* **2019**, *20*, doi:10.3390/ijms20163926.
148. Lewis, B.P.; Burge, C.B.; Bartel, D.P. Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. *Cell* **2005**, *120*, 15-20, doi:10.1016/j.cell.2004.12.035.
149. Zhou, X.; Yang, P.C. MicroRNA: a small molecule with a big biological impact. *Microrna* **2012**, *1*, 1, doi:10.2174/2211536611201010001.
150. Sakshi, S.; Jayasuriya, R.; Ganesan, K.; Xu, B.; Ramkumar, K.M. Role of circRNA-miRNA-mRNA interaction network in diabetes and its associated complications. *Mol Ther Nucleic Acids* **2021**, *26*, 1291-1302, doi:10.1016/j.omtn.2021.11.007.
151. Panda, A.C. Circular RNAs Act as miRNA Sponges. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1087*, 67-79, doi:10.1007/978-981-13-1426-1_6.
152. Zhao, J.; Zhou, Y.; Guo, M.; Yue, D.; Chen, C.; Liang, G.; Xu, L. MicroRNA-7: expression and function in brain physiological and pathological processes. *Cell Biosci* **2020**, *10*, 77, doi:10.1186/s13578-020-00436-w.
153. Piwecka, M.; Glazar, P.; Hernandez-Miranda, L.R.; Memczak, S.; Wolf, S.A.; Rybak-Wolf, A.; Filipchyk, A.; Kironomos, F.; Cerda Jara, C.A.; Fenske, P., et al. Loss of a mammalian circular RNA locus causes miRNA deregulation and affects brain function. *Science* **2017**, *357*, doi:10.1126/science.aam8526.
154. Li, L.; Zheng, Y.C.; Kayani, M.U.R.; Xu, W.; Wang, G.Q.; Sun, P.; Ao, N.; Zhang, L.N.; Gu, Z.Q.; Wu, L.C., et al. Comprehensive analysis of circRNA expression profiles in humans by RAISE. *Int J Oncol* **2017**, *51*, 1625-1638, doi:10.3892/ijo.2017.4162.
155. Du, W.W.; Zhang, C.; Yang, W.; Yong, T.; Awan, F.M.; Yang, B.B. Identifying and Characterizing circRNA-Protein Interaction. *Theranostics* **2017**, *7*, 4183-4191, doi:10.7150/thno.21299.
156. Huang, A.; Zheng, H.; Wu, Z.; Chen, M.; Huang, Y. Circular RNA-protein interactions: functions, mechanisms, and identification. *Theranostics* **2020**, *10*, 3503-3517, doi:10.7150/thno.42174.
157. Du, W.W.; Fang, L.; Yang, W.; Wu, N.; Awan, F.M.; Yang, Z.; Yang, B.B. Induction of tumor apoptosis through a circular RNA enhancing Foxo3 activity. *Cell Death Differ* **2017**, *24*, 357-370, doi:10.1038/cdd.2016.133.
158. Huang, S.; Li, X.; Zheng, H.; Si, X.; Li, B.; Wei, G.; Li, C.; Chen, Y.; Chen, Y.; Liao, W., et al. Loss of Super-Enhancer-Regulated circRNA Nfix Induces Cardiac Regeneration After Myocardial Infarction in Adult Mice. *Circulation* **2019**, *139*, 2857-2876, doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.118.038361.
159. Yang, F.; Fang, E.; Mei, H.; Chen, Y.; Li, H.; Li, D.; Song, H.; Wang, J.; Hong, M.; Xiao, W., et al. Cis-Acting circ-CTNNB1 Promotes beta-Catenin Signaling and Cancer Progression via DDX3-Mediated Transactivation of YY1. *Cancer Res* **2019**, *79*, 557-571, doi:10.1158/0008-5472.CAN-18-1559.
160. Yang, Q.; Du, W.W.; Wu, N.; Yang, W.; Awan, F.M.; Fang, L.; Ma, J.; Li, X.; Zeng, Y.; Yang, Z., et al. A circular RNA promotes tumorigenesis by inducing c-myc nuclear translocation. *Cell Death Differ* **2017**, *24*, 1609-1620, doi:10.1038/cdd.2017.86.
161. Wang, S.; Zhang, Y.; Cai, Q.; Ma, M.; Jin, L.Y.; Weng, M.; Zhou, D.; Tang, Z.; Wang, J.D.; Quan, Z. Circular RNA FOXP1 promotes tumor progression and Warburg effect in gallbladder cancer by regulating PKLR expression. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 145, doi:10.1186/s12943-019-1078-z.
162. Shao, T.; Pan, Y.H.; Xiong, X.D. Circular RNA: an important player with multiple facets to regulate its parental gene expression. *Mol Ther Nucleic Acids* **2021**, *23*, 369-376, doi:10.1016/j.omtn.2020.11.008.
163. Li, Z.; Huang, C.; Bao, C.; Chen, L.; Lin, M.; Wang, X.; Zhong, G.; Yu, B.; Hu, W.; Dai, L., et al. Exon-intron circular RNAs regulate transcription in the nucleus. *Nat Struct Mol Biol* **2015**, *22*, 256-264, doi:10.1038/nsmb.2959.

164. Barbagallo, D.; Caponnetto, A.; Cirnigliaro, M.; Brex, D.; Barbagallo, C.; D'Angeli, F.; Morrone, A.; Caltabiano, R.; Barbagallo, G.M.; Ragusa, M., et al. CircSMARCA5 Inhibits Migration of Glioblastoma Multiforme Cells by Regulating a Molecular Axis Involving Splicing Factors SRSF1/SRSF3/PTB. *Int J Mol Sci* **2018**, *19*, doi:10.3390/ijms19020480.
165. Conn, V.M.; Hugouvieux, V.; Nayak, A.; Conos, S.A.; Capovilla, G.; Cildir, G.; Jourdain, A.; Tergaonkar, V.; Schmid, M.; Zubieta, C., et al. A circRNA from SEPALLATA3 regulates splicing of its cognate mRNA through R-loop formation. *Nat Plants* **2017**, *3*, 17053, doi:10.1038/nplants.2017.53.
166. Abdelmohsen, K.; Panda, A.C.; Munk, R.; Grammatikakis, I.; Dudekula, D.B.; De, S.; Kim, J.; Noh, J.H.; Kim, K.M.; Martindale, J.L., et al. Identification of HuR target circular RNAs uncovers suppression of PABPN1 translation by CircPABPN1. *RNA Biol* **2017**, *14*, 361-369, doi:10.1080/15476286.2017.1279788.
167. Liu, B.; Yang, G.; Wang, X.; Liu, J.; Lu, Z.; Wang, Q.; Xu, B.; Liu, Z.; Li, J. CircBACH1 (hsa_circ_0061395) promotes hepatocellular carcinoma growth by regulating p27 repression via HuR. *J Cell Physiol* **2020**, *235*, 6929-6941, doi:10.1002/jcp.29589.
168. Pamudurti, N.R.; Bartok, O.; Jens, M.; Ashwal-Fluss, R.; Stottmeister, C.; Ruhe, L.; Hanan, M.; Wyler, E.; Perez-Hernandez, D.; Ramberger, E., et al. Translation of CircRNAs. *Mol Cell* **2017**, *66*, 9-21 e27, doi:10.1016/j.molcel.2017.02.021.
169. Abe, N.; Matsumoto, K.; Nishihara, M.; Nakano, Y.; Shibata, A.; Maruyama, H.; Shuto, S.; Matsuda, A.; Yoshida, M.; Ito, Y., et al. Rolling Circle Translation of Circular RNA in Living Human Cells. *Sci Rep* **2015**, *5*, 16435, doi:10.1038/srep16435.
170. Wilusz, J.E. Circular RNAs: Unexpected outputs of many protein-coding genes. *RNA Biol* **2017**, *14*, 1007-1017, doi:10.1080/15476286.2016.1227905.
171. Merrick, W.C. Cap-dependent and cap-independent translation in eukaryotic systems. *Gene* **2004**, *332*, 1-11, doi:10.1016/j.gene.2004.02.051.
172. Meyer, K.D.; Patil, D.P.; Zhou, J.; Zinoviev, A.; Skabkin, M.A.; Elemento, O.; Pestova, T.V.; Qian, S.B.; Jaffrey, S.R. 5' UTR m(6)A Promotes Cap-Independent Translation. *Cell* **2015**, *163*, 999-1010, doi:10.1016/j.cell.2015.10.012.
173. Yang, Y.; Fan, X.; Mao, M.; Song, X.; Wu, P.; Zhang, Y.; Jin, Y.; Yang, Y.; Chen, L.L.; Wang, Y., et al. Extensive translation of circular RNAs driven by N(6)-methyladenosine. *Cell Res* **2017**, *27*, 626-641, doi:10.1038/cr.2017.31.
174. Legnini, I.; Di Timoteo, G.; Rossi, F.; Morlando, M.; Briganti, F.; Sthandier, O.; Fatica, A.; Santini, T.; Andronache, A.; Wade, M., et al. Circ-ZNF609 Is a Circular RNA that Can Be Translated and Functions in Myogenesis. *Mol Cell* **2017**, *66*, 22-37 e29, doi:10.1016/j.molcel.2017.02.017.
175. Yang, Y.; Gao, X.; Zhang, M.; Yan, S.; Sun, C.; Xiao, F.; Huang, N.; Yang, X.; Zhao, K.; Zhou, H., et al. Novel Role of FBXW7 Circular RNA in Repressing Glioma Tumorigenesis. *J Natl Cancer Inst* **2018**, *110*, 304-315, doi:10.1093/jnci/djx166.
176. Eguen, T.; Straub, D.; Graeff, M.; Wenkel, S. MicroProteins: small size-big impact. *Trends Plant Sci* **2015**, *20*, 477-482, doi:10.1016/j.tplants.2015.05.011.
177. Straub, D.; Wenkel, S. Cross-Species Genome-Wide Identification of Evolutionary Conserved MicroProteins. *Genome Biol Evol* **2017**, *9*, 777-789, doi:10.1093/gbe/evx041.
178. Zhang, M.; Huang, N.; Yang, X.; Luo, J.; Yan, S.; Xiao, F.; Chen, W.; Gao, X.; Zhao, K.; Zhou, H., et al. A novel protein encoded by the circular form of the SHPRH gene suppresses glioma tumorigenesis. *Oncogene* **2018**, *37*, 1805-1814, doi:10.1038/s41388-017-0019-9.
179. Chen, R.; Wang, S.K.; Belk, J.A.; Amaya, L.; Li, Z.; Cardenas, A.; Abe, B.T.; Chen, C.K.; Wender, P.A.; Chang, H.Y. Engineering circular RNA for enhanced protein production. *Nat Biotechnol* **2023**, *41*, 262-272, doi:10.1038/s41587-022-01393-0.
180. Salzman, J.; Chen, R.E.; Olsen, M.N.; Wang, P.L.; Brown, P.O. Cell-type specific features of circular RNA expression. *PLoS Genet* **2013**, *9*, e1003777, doi:10.1371/journal.pgen.1003777.
181. Xia, S.; Feng, J.; Lei, L.; Hu, J.; Xia, L.; Wang, J.; Xiang, Y.; Liu, L.; Zhong, S.; Han, L., et al. Comprehensive characterization of tissue-specific circular RNAs in the human and mouse genomes. *Brief Bioinform* **2017**, *18*, 984-992, doi:10.1093/bib/bbw081.

182. Cabili, M.N.; 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*, 1915-1927, doi:10.1101/gad.17446611.
183. Dong, R.; Ma, X.K.; Li, G.W.; Yang, L. CIRCpedia v2: An Updated Database for Comprehensive Circular RNA Annotation and Expression Comparison. *Genomics Proteomics Bioinformatics* **2018**, *16*, 226-233, doi:10.1016/j.gpb.2018.08.001.
184. Xu, T.; Wu, J.; Han, P.; Zhao, Z.; Song, X. Circular RNA expression profiles and features in human tissues: a study using RNA-seq data. *BMC Genomics* **2017**, *18*, 680, doi:10.1186/s12864-017-4029-3.
185. Chen, B.J.; Huang, S.; Janitz, M. Changes in circular RNA expression patterns during human foetal brain development. *Genomics* **2019**, *111*, 753-758, doi:10.1016/j.ygeno.2018.04.015.
186. Bachmayr-Heyda, A.; Reiner, A.T.; Auer, K.; Sukhbaatar, N.; Aust, S.; Bachleitner-Hofmann, T.; Mesteri, I.; Grunt, T.W.; Zeillinger, R.; Pils, D. Correlation of circular RNA abundance with proliferation--exemplified with colorectal and ovarian cancer, idiopathic lung fibrosis, and normal human tissues. *Sci Rep* **2015**, *5*, 8057, doi:10.1038/srep08057.
187. Du, W.W.; Yang, W.; Chen, Y.; Wu, Z.K.; Foster, F.S.; Yang, Z.; Li, X.; Yang, B.B. Foxo3 circular RNA promotes cardiac senescence by modulating multiple factors associated with stress and senescence responses. *Eur Heart J* **2017**, *38*, 1402-1412, doi:10.1093/eurheartj/ehw001.
188. Qiu, W.; Wang, X.; Buchanan, M.; He, K.; Sharma, R.; Zhang, L.; Wang, Q.; Yu, J. ADAR1 is essential for intestinal homeostasis and stem cell maintenance. *Cell Death Dis* **2013**, *4*, e599, doi:10.1038/cddis.2013.125.
189. Knupp, D.; Miura, P. CircRNA accumulation: A new hallmark of aging? *Mech Ageing Dev* **2018**, *173*, 71-79, doi:10.1016/j.mad.2018.05.001.
190. Xia, S.; Feng, J.; Chen, K.; Ma, Y.; Gong, J.; Cai, F.; Jin, Y.; Gao, Y.; Xia, L.; Chang, H., et al. CSCD: a database for cancer-specific circular RNAs. *Nucleic Acids Res* **2018**, *46*, D925-D929, doi:10.1093/nar/gkx863.
191. Xu, L.; Lyu, M.; Yang, S.; Zhang, J.; Yu, D. CircRNA expression profiles of breast cancer and construction of a circRNA-miRNA-mRNA network. *Sci Rep* **2022**, *12*, 17765, doi:10.1038/s41598-022-21877-y.
192. Xu, J.Z.; Shao, C.C.; Wang, X.J.; Zhao, X.; Chen, J.Q.; Ouyang, Y.X.; Feng, J.; Zhang, F.; Huang, W.H.; Ying, Q., et al. circTADA2As suppress breast cancer progression and metastasis via targeting miR-203a-3p/SOCS3 axis. *Cell Death Dis* **2019**, *10*, 175, doi:10.1038/s41419-019-1382-y.
193. Gao, Y.L.; Zhang, M.Y.; Xu, B.; Han, L.J.; Lan, S.F.; Chen, J.; Dong, Y.J.; Cao, L.L. Circular RNA expression profiles reveal that hsa_circ_0018289 is up-regulated in cervical cancer and promotes the tumorigenesis. *Oncotarget* **2017**, *8*, 86625-86633, doi:10.18632/oncotarget.21257.
194. Guarnerio, J.; Bezzi, M.; Jeong, J.C.; Paffenholz, S.V.; Berry, K.; Naldini, M.M.; Lo-Coco, F.; Tay, Y.; Beck, A.H.; Pandolfi, P.P. Oncogenic Role of Fusion-circRNAs Derived from Cancer-Associated Chromosomal Translocations. *Cell* **2016**, *165*, 289-302, doi:10.1016/j.cell.2016.03.020.
195. Patop, I.L.; Kadener, S. circRNAs in Cancer. *Curr Opin Genet Dev* **2018**, *48*, 121-127, doi:10.1016/j.gde.2017.11.007.
196. Lu, D.; Xu, A.D. Mini Review: Circular RNAs as Potential Clinical Biomarkers for Disorders in the Central Nervous System. *Front Genet* **2016**, *7*, 53, doi:10.3389/fgene.2016.00053.
197. Hanahan, D.; Weinberg, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **2011**, *144*, 646-674, doi:10.1016/j.cell.2011.02.013.
198. Su, M.; Xiao, Y.; Ma, J.; Tang, Y.; Tian, B.; Zhang, Y.; Li, X.; Wu, Z.; Yang, D.; Zhou, Y., et al. Circular RNAs in Cancer: emerging functions in hallmarks, stemness, resistance and roles as potential biomarkers. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 90, doi:10.1186/s12943-019-1002-6.
199. Du, W.W.; Yang, W.; Liu, E.; Yang, Z.; Dhaliwal, P.; Yang, B.B. Foxo3 circular RNA retards cell cycle progression via forming ternary complexes with p21 and CDK2. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, 2846-2858, doi:10.1093/nar/gkw027.

200. Wang, F.; Wang, J.; Cao, X.; Xu, L.; Chen, L. Hsa_circ_0014717 is downregulated in colorectal cancer and inhibits tumor growth by promoting p16 expression. *Biomed Pharmacother* **2018**, *98*, 775-782, doi:10.1016/j.biopha.2018.01.015.
201. Yao, Z.; Luo, J.; Hu, K.; Lin, J.; Huang, H.; Wang, Q.; Zhang, P.; Xiong, Z.; He, C.; Huang, Z., et al. ZKSCAN1 gene and its related circular RNA (circZKSCAN1) both inhibit hepatocellular carcinoma cell growth, migration, and invasion but through different signaling pathways. *Mol Oncol* **2017**, *11*, 422-437, doi:10.1002/1878-0261.12045.
202. Han, D.; Li, J.; Wang, H.; Su, X.; Hou, J.; Gu, Y.; Qian, C.; Lin, Y.; Liu, X.; Huang, M., et al. Circular RNA circMTO1 acts as the sponge of microRNA-9 to suppress hepatocellular carcinoma progression. *Hepatology* **2017**, *66*, 1151-1164, doi:10.1002/hep.29270.
203. Li, B.; Xie, F.; Zheng, F.X.; Jiang, G.S.; Zeng, F.Q.; Xiao, X.Y. Overexpression of CircRNA BCRC4 regulates cell apoptosis and MicroRNA-101/EZH2 signaling in bladder cancer. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci* **2017**, *37*, 886-890, doi:10.1007/s11596-017-1822-9.
204. Lu, H.; Han, X.; Ren, J.; Ren, K.; Li, Z.; Sun, Z. Circular RNA HIPK3 induces cell proliferation and inhibits apoptosis in non-small cell lung cancer through sponging miR-149. *Cancer Biol Ther* **2020**, *21*, 113-121, doi:10.1080/15384047.2019.1669995.
205. Shay, J.W.; Wright, W.E. Role of telomeres and telomerase in cancer. *Semin Cancer Biol* **2011**, *21*, 349-353, doi:10.1016/j.semcancer.2011.10.001.
206. Zhang, X.L.; Xu, L.L.; Wang, F. Hsa_circ_0020397 regulates colorectal cancer cell viability, apoptosis and invasion by promoting the expression of the miR-138 targets TERT and PD-L1. *Cell Biol Int* **2017**, *41*, 1056-1064, doi:10.1002/cbin.10826.
207. Boeckel, J.N.; Jae, N.; Heumuller, A.W.; Chen, W.; Boon, R.A.; Stellos, K.; Zeiher, A.M.; John, D.; Uchida, S.; Dimmeler, S. Identification and Characterization of Hypoxia-Regulated Endothelial Circular RNA. *Circ Res* **2015**, *117*, 884-890, doi:10.1161/CIRCRESAHA.115.306319.
208. Li, J.; Huang, C.; Zou, Y.; Yu, J.; Gui, Y. Circular RNA MYLK promotes tumour growth and metastasis via modulating miR-513a-5p/VEGFC signalling in renal cell carcinoma. *J Cell Mol Med* **2020**, *24*, 6609-6621, doi:10.1111/jcmm.15308.
209. Hsiao, K.Y.; Lin, Y.C.; Gupta, S.K.; Chang, N.; Yen, L.; Sun, H.S.; Tsai, S.J. Noncoding Effects of Circular RNA CCDC66 Promote Colon Cancer Growth and Metastasis. *Cancer Res* **2017**, *77*, 2339-2350, doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-1883.
210. Guo, X.; Zhou, Q.; Su, D.; Luo, Y.; Fu, Z.; Huang, L.; Li, Z.; Jiang, D.; Kong, Y.; Li, Z., et al. Circular RNA circBFAR promotes the progression of pancreatic ductal adenocarcinoma via the miR-34b-5p/MET/Akt axis. *Mol Cancer* **2020**, *19*, 83, doi:10.1186/s12943-020-01196-4.
211. Chen, R.X.; Chen, X.; Xia, L.P.; Zhang, J.X.; Pan, Z.Z.; Ma, X.D.; Han, K.; Chen, J.W.; Judde, J.G.; Deas, O., et al. N(6)-methyladenosine modification of circNSUN2 facilitates cytoplasmic export and stabilizes HMGA2 to promote colorectal liver metastasis. *Nat Commun* **2019**, *10*, 4695, doi:10.1038/s41467-019-12651-2.
212. Coussens, L.M.; Werb, Z. Inflammation and cancer. *Nature* **2002**, *420*, 860-867, doi:10.1038/nature01322.
213. Zhao, H.; Wu, L.; Yan, G.; Chen, Y.; Zhou, M.; Wu, Y.; Li, Y. Inflammation and tumor progression: signaling pathways and targeted intervention. *Signal Transduct Target Ther* **2021**, *6*, 263, doi:10.1038/s41392-021-00658-5.
214. Song, H.; Liu, Q.; Liao, Q. Circular RNA and tumor microenvironment. *Cancer Cell Int* **2020**, *20*, 211, doi:10.1186/s12935-020-01301-z.
215. Shi, L.; Yan, P.; Liang, Y.; Sun, Y.; Shen, J.; Zhou, S.; Lin, H.; Liang, X.; Cai, X. Circular RNA expression is suppressed by androgen receptor (AR)-regulated adenosine deaminase that acts on RNA (ADAR1) in human hepatocellular carcinoma. *Cell Death Dis* **2017**, *8*, e3171, doi:10.1038/cddis.2017.556.
216. Li, Q.; Wang, Y.; Wu, S.; Zhou, Z.; Ding, X.; Shi, R.; Thorne, R.F.; Zhang, X.D.; Hu, W.; Wu, M. CircACC1 Regulates Assembly and Activation of AMPK Complex under Metabolic Stress. *Cell Metab* **2019**, *30*, 157-173 e157, doi:10.1016/j.cmet.2019.05.009.
217. Li, Q.; Pan, X.; Zhu, D.; Deng, Z.; Jiang, R.; Wang, X. Circular RNA MAT2B Promotes Glycolysis and Malignancy of Hepatocellular Carcinoma Through the miR-338-3p/PKM2 Axis Under Hypoxic Stress. *Hepatology* **2019**, *70*, 1298-1316, doi:10.1002/hep.30671.

218. Zhang, P.F.; Pei, X.; Li, K.S.; Jin, L.N.; Wang, F.; Wu, J.; Zhang, X.M. Circular RNA circFGFR1 promotes progression and anti-PD-1 resistance by sponging miR-381-3p in non-small cell lung cancer cells. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 179, doi:10.1186/s12943-019-1111-2.
219. Chen, L.; Shan, G. CircRNA in cancer: Fundamental mechanism and clinical potential. *Cancer Lett* **2021**, *505*, 49-57, doi:10.1016/j.canlet.2021.02.004.
220. Pfafenrot, C.; Preusser, C. Establishing essential quality criteria for the validation of circular RNAs as biomarkers. *Biomol Detect Quantif* **2019**, *17*, 100085, doi:10.1016/j.bdq.2019.100085.
221. Vo, J.N.; Cieslik, M.; Zhang, Y.; Shukla, S.; Xiao, L.; Zhang, Y.; Wu, Y.M.; Dhanasekaran, S.M.; Engelke, C.G.; Cao, X., et al. The Landscape of Circular RNA in Cancer. *Cell* **2019**, *176*, 869-881 e813, doi:10.1016/j.cell.2018.12.021.
222. Song, X.; Zhang, N.; Han, P.; Moon, B.S.; Lai, R.K.; Wang, K.; Lu, W. Circular RNA profile in gliomas revealed by identification tool UROBORUS. *Nucleic Acids Res* **2016**, *44*, e87, doi:10.1093/nar/gkw075.
223. Zhu, J.; Ye, J.; Zhang, L.; Xia, L.; Hu, H.; Jiang, H.; Wan, Z.; Sheng, F.; Ma, Y.; Li, W., et al. Differential Expression of Circular RNAs in Glioblastoma Multiforme and Its Correlation with Prognosis. *Transl Oncol* **2017**, *10*, 271-279, doi:10.1016/j.tranon.2016.12.006.
224. Qian, L.; Guan, J.; Wu, Y.; Wang, Q. Upregulated circular RNA circ_0074027 promotes glioblastoma cell growth and invasion by regulating miR-518a-5p/IL17RD signaling pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **2019**, *510*, 515-519, doi:10.1016/j.bbrc.2019.01.140.
225. Cao, Y.; Wang, F.; Chen, Y.; Wang, Y.; Song, H.; Long, J. CircPITX1 Regulates Proliferation, Angiogenesis, Migration, Invasion, and Cell Cycle of Human Glioblastoma Cells by Targeting miR-584-5p/KPNB1 Axis. *J Mol Neurosci* **2021**, *71*, 1683-1695, doi:10.1007/s12031-021-01820-y.
226. Zhou, J.; Wang, H.; Hong, F.; Hu, S.; Su, X.; Chen, J.; Chu, J. CircularRNA circPARP4 promotes glioblastoma progression through sponging miR-125a-5p and regulating FUT4. *Am J Cancer Res* **2021**, *11*, 138-156.
227. Wang, R.; Zhang, S.; Chen, X.; Li, N.; Li, J.; Jia, R.; Pan, Y.; Liang, H. EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis. *Mol Cancer* **2018**, *17*, 166, doi:10.1186/s12943-018-0911-0.
228. Xia, B.; Hong, T.; He, X.; Hu, X.; Gao, Y. A circular RNA derived from MMP9 facilitates oral squamous cell carcinoma metastasis through regulation of MMP9 mRNA stability. *Cell Transplant* **2019**, *28*, 1614-1623, doi:10.1177/0963689719875409.
229. Hardee, M.E.; Zagzag, D. Mechanisms of glioma-associated neovascularization. *Am J Pathol* **2012**, *181*, 1126-1141, doi:10.1016/j.ajpath.2012.06.030.
230. Barbagallo, D.; Caponnetto, A.; Brex, D.; Mirabella, F.; Barbagallo, C.; Lauretta, G.; Morrone, A.; Certo, F.; Broggi, G.; Caltabiano, R., et al. CircSMARCA5 Regulates VEGFA mRNA Splicing and Angiogenesis in Glioblastoma Multiforme Through the Binding of SRSF1. *Cancers (Basel)* **2019**, *11*, doi:10.3390/cancers11020194.
231. Gao, X.; Xia, X.; Li, F.; Zhang, M.; Zhou, H.; Wu, X.; Zhong, J.; Zhao, Z.; Zhao, K.; Liu, D., et al. Circular RNA-encoded oncogenic E-cadherin variant promotes glioblastoma tumorigenicity through activation of EGFR-STAT3 signalling. *Nat Cell Biol* **2021**, *23*, 278-291, doi:10.1038/s41556-021-00639-4.
232. Liu, Y.; Li, Z.; Zhang, M.; Zhou, H.; Wu, X.; Zhong, J.; Xiao, F.; Huang, N.; Yang, X.; Zeng, R., et al. Rolling-translated EGFR variants sustain EGFR signaling and promote glioblastoma tumorigenicity. *Neuro Oncol* **2021**, *23*, 743-756, doi:10.1093/neuonc/noaa279.
233. Xia, X.; Li, X.; Li, F.; Wu, X.; Zhang, M.; Zhou, H.; Huang, N.; Yang, X.; Xiao, F.; Liu, D., et al. A novel tumor suppressor protein encoded by circular AKT3 RNA inhibits glioblastoma tumorigenicity by competing with active phosphoinositide-dependent Kinase-1. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 131, doi:10.1186/s12943-019-1056-5.
234. Zhang, M.; Zhao, K.; Xu, X.; Yang, Y.; Yan, S.; Wei, P.; Liu, H.; Xu, J.; Xiao, F.; Zhou, H., et al. A peptide encoded by circular form of LINC-PINT suppresses oncogenic transcriptional elongation in glioblastoma. *Nat Commun* **2018**, *9*, 4475, doi:10.1038/s41467-018-06862-2.
235. Wei, Y.; Lu, C.; Zhou, P.; Zhao, L.; Lyu, X.; Yin, J.; Shi, Z.; You, Y. EIF4A3-induced circular RNA ASAP1 promotes tumorigenesis and temozolomide resistance of glioblastoma

- via NRAS/MEK1/ERK1-2 signaling. *Neuro Oncol* **2021**, *23*, 611-624, doi:10.1093/neuonc/noaa214.
236. Zhang, G.; Sun, W.; Zhu, L.; Feng, Y.; Wu, L.; Li, T. Overexpressed circ_0029426 in glioblastoma forecasts unfavorable prognosis and promotes cell progression by sponging miR-197. *J Cell Biochem* **2019**, *120*, 10295-10302, doi:10.1002/jcb.28313.
237. Lv, X.; Wang, M.; Qiang, J.; Guo, S. Circular RNA circ-PITX1 promotes the progression of glioblastoma by acting as a competing endogenous RNA to regulate miR-379-5p/MAP3K2 axis. *Eur J Pharmacol* **2019**, *863*, 172643, doi:10.1016/j.ejphar.2019.172643.
238. Liu, R.; Dai, W.; Wu, A.; Li, Y. CircCDC45 promotes the malignant progression of glioblastoma by modulating the miR-485-5p/CSF-1 axis. *BMC Cancer* **2021**, *21*, 1090, doi:10.1186/s12885-021-08803-7.
239. Zhao, M.; Xu, J.; Zhong, S.; Liu, Y.; Xiao, H.; Geng, L.; Liu, H. Expression profiles and potential functions of circular RNAs in extracellular vesicles isolated from radioresistant glioma cells. *Oncol Rep* **2019**, *41*, 1893-1900, doi:10.3892/or.2019.6972.
240. Katsushima, K.; Joshi, K.; Perera, R.J. Diagnostic and therapeutic potential of circular RNA in brain tumors. *Neurooncol Adv* **2023**, *5*, vdad063, doi:10.1093/nojnl/vdad063.
241. Vinci, M.; Gowan, S.; Boxall, F.; Patterson, L.; Zimmermann, M.; Court, W.; Lomas, C.; Mendiola, M.; Hardisson, D.; Eccles, S.A. Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation. *BMC Biol* **2012**, *10*, 29, doi:10.1186/1741-7007-10-29.
242. Chen, L.; Wang, F.; Bruggeman, E.C.; Li, C.; Yao, B. circMeta: a unified computational framework for genomic feature annotation and differential expression analysis of circular RNAs. *Bioinformatics* **2020**, *36*, 539-545, doi:10.1093/bioinformatics/btz606.
243. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139-140, doi:10.1093/bioinformatics/btp616.
244. Li, H. Toward better understanding of artifacts in variant calling from high-coverage samples. *Bioinformatics* **2014**, *30*, 2843-2851, doi:10.1093/bioinformatics/btu356.
245. Gerstberger, S.; Hafner, M.; Tuschl, T. A census of human RNA-binding proteins. *Nat Rev Genet* **2014**, *15*, 829-845, doi:10.1038/nrg3813.
246. Hossain, M.T.; Peng, Y.; Feng, S.; Wei, Y. FcircSEC: An R Package for Full Length circRNA Sequence Extraction and Classification. *Int J Genomics* **2020**, *2020*, 9084901, doi:10.1155/2020/9084901.
247. Van Nostrand, E.L.; Freese, P.; Pratt, G.A.; Wang, X.; Wei, X.; Xiao, R.; Blue, S.M.; Chen, J.Y.; Cody, N.A.L.; Dominguez, D., et al. A large-scale binding and functional map of human RNA-binding proteins. *Nature* **2020**, *583*, 711-719, doi:10.1038/s41586-020-2077-3.
248. Dominguez, D.; Freese, P.; Alexis, M.S.; Su, A.; Hochman, M.; Palden, T.; Bazile, C.; Lambert, N.J.; Van Nostrand, E.L.; Pratt, G.A., et al. Sequence, Structure, and Context Preferences of Human RNA Binding Proteins. *Mol Cell* **2018**, *70*, 854-867 e859, doi:10.1016/j.molcel.2018.05.001.
249. Buratin, A.; Gaffo, E.; Dal Molin, A.; Bortoluzzi, S. CircIMPACT: An R Package to Explore Circular RNA Impact on Gene Expression and Pathways. *Genes (Basel)* **2021**, *12*, doi:10.3390/genes12071044.
250. Myers, S.A.; Rhoads, A.; Cocco, A.R.; Peckner, R.; Haber, A.L.; Schweitzer, L.D.; Krug, K.; Mani, D.R.; Clauser, K.R.; Rozenblatt-Rosen, O., et al. Streamlined Protocol for Deep Proteomic Profiling of FAC-sorted Cells and Its Application to Freshly Isolated Murine Immune Cells. *Mol Cell Proteomics* **2019**, *18*, 995-1009, doi:10.1074/mcp.RA118.001259.
251. Doellinger, J.; Schneider, A.; Hoeller, M.; Lasch, P. Sample Preparation by Easy Extraction and Digestion (SPEED) - A Universal, Rapid, and Detergent-free Protocol for Proteomics Based on Acid Extraction. *Mol Cell Proteomics* **2020**, *19*, 209-222, doi:10.1074/mcp.TIR119.001616.
252. Gaffo, E.; Buratin, A.; Dal Molin, A.; Bortoluzzi, S. Sensitive, reliable and robust circRNA detection from RNA-seq with CirComPara2. *Brief Bioinform* **2022**, *23*, doi:10.1093/bib/bbab418.

253. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, *15*, 550, doi:10.1186/s13059-014-0550-8.
254. Chen, L.L. The biogenesis and emerging roles of circular RNAs. *Nat Rev Mol Cell Biol* **2016**, *17*, 205-211, doi:10.1038/nrm.2015.32.
255. Li, J.; Di, C.; Mattox, A.K.; Wu, L.; Adamson, D.C. The future role of personalized medicine in the treatment of glioblastoma multiforme. *Pharmgenomics Pers Med* **2010**, *3*, 111-127, doi:10.2147/PGPM.S6852.
256. Micheletti, C.; Bonetti, G.; Madeo, G.; Gadler, M.; Benedetti, S.; Guerri, G.; Cristofoli, F.; Generali, D.; Donofrio, C.A.; Cominetti, M., et al. Omics sciences and precision medicine in glioblastoma. *Clin Ter* **2023**, *174*, 77-84, doi:10.7417/CT.2023.2474.
257. Pavon, L.F.; Marti, L.C.; Sibov, T.T.; Malheiros, S.M.; Brandt, R.A.; Cavalheiro, S.; Gamarra, L.F. In vitro Analysis of Neurospheres Derived from Glioblastoma Primary Culture: A Novel Methodology Paradigm. *Front Neurol* **2014**, *4*, 214, doi:10.3389/fneur.2013.00214.
258. Yang, Q.; Li, F.; He, A.T.; Yang, B.B. Circular RNAs: Expression, localization, and therapeutic potentials. *Mol Ther* **2021**, *29*, 1683-1702, doi:10.1016/j.yymthe.2021.01.018.
259. Ortensi, B.; Setti, M.; Osti, D.; Pelicci, G. Cancer stem cell contribution to glioblastoma invasiveness. *Stem Cell Res Ther* **2013**, *4*, 18, doi:10.1186/scrt166.
260. Liang, D.; Wilusz, J.E. Short intronic repeat sequences facilitate circular RNA production. *Genes Dev* **2014**, *28*, 2233-2247, doi:10.1101/gad.251926.114.
261. Khan, S.; Jha, A.; Panda, A.C.; Dixit, A. Cancer-Associated circRNA-miRNA-mRNA Regulatory Networks: A Meta-Analysis. *Front Mol Biosci* **2021**, *8*, 671309, doi:10.3389/fmolb.2021.671309.
262. Yin, J.; Zeng, A.; Zhang, Z.; Shi, Z.; Yan, W.; You, Y. Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma. *EBioMedicine* **2019**, *42*, 238-251, doi:10.1016/j.ebiom.2019.03.016.
263. Doktorova, H.; Hrabeta, J.; Khalil, M.A.; Eckschlager, T. Hypoxia-induced chemoresistance in cancer cells: The role of not only HIF-1. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* **2015**, *159*, 166-177, doi:10.5507/bp.2015.025.
264. Muz, B.; de la Puente, P.; Azab, F.; Azab, A.K. The role of hypoxia in cancer progression, angiogenesis, metastasis, and resistance to therapy. *Hypoxia (Auckl)* **2015**, *3*, 83-92, doi:10.2147/HP.S93413.
265. Nisar, S.; Bhat, A.A.; Singh, M.; Karedath, T.; Rizwan, A.; Hashem, S.; Bagga, P.; Reddy, R.; Jamal, F.; Uddin, S., et al. Insights Into the Role of CircRNAs: Biogenesis, Characterization, Functional, and Clinical Impact in Human Malignancies. *Front Cell Dev Biol* **2021**, *9*, 617281, doi:10.3389/fcell.2021.617281.
266. Das, A.; Sinha, T.; Shyamal, S.; Panda, A.C. Emerging Role of Circular RNA-Protein Interactions. *Noncoding RNA* **2021**, *7*, doi:10.3390/ncrna7030048.
267. Zhang, Y.; Qi, W.; Wu, Y. EIF4A3-induced circular RNA SCAP facilitates tumorigenesis and progression of non-small-cell lung cancer via miR-7/SMAD2 signaling. *Environ Sci Pollut Res Int* **2023**, *30*, 65237-65249, doi:10.1007/s11356-023-26307-8.
268. Li, J.H.; Liu, S.; Zhou, H.; Qu, L.H.; Yang, J.H. starBase v2.0: decoding miRNA-ceRNA, miRNA-ncRNA and protein-RNA interaction networks from large-scale CLIP-Seq data. *Nucleic Acids Res* **2014**, *42*, D92-97, doi:10.1093/nar/gkt1248.
269. Gawade, K.; Plewka, P.; Hafner, S.J.; Lund, A.H.; Marchand, V.; Motorin, Y.; Szczesniak, M.W.; Raczynska, K.D. FUS regulates a subset of snoRNA expression and modulates the level of rRNA modifications. *Sci Rep* **2023**, *13*, 2974, doi:10.1038/s41598-023-30068-2.
270. Aldape, K.; Brindle, K.M.; Chesler, L.; Chopra, R.; Gajjar, A.; Gilbert, M.R.; Gottardo, N.; Gutmann, D.H.; Hargrave, D.; Holland, E.C., et al. Challenges to curing primary brain tumours. *Nat Rev Clin Oncol* **2019**, *16*, 509-520, doi:10.1038/s41571-019-0177-5.
271. Davis, M.E. Glioblastoma: Overview of Disease and Treatment. *Clin J Oncol Nurs* **2016**, *20*, S2-8, doi:10.1188/16.CJON.S1.2-8.
272. Seker-Polat, F.; Pinarbasi Degirmenci, N.; Solaroglu, I.; Bagci-Onder, T. Tumor Cell Infiltration into the Brain in Glioblastoma: From Mechanisms to Clinical Perspectives. *Cancers (Basel)* **2022**, *14*, doi:10.3390/cancers14020443.

273. Zhang, P.; Xia, Q.; Liu, L.; Li, S.; Dong, L. Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy. *Front Mol Biosci* **2020**, *7*, 562798, doi:10.3389/fmolb.2020.562798.
274. Steponaitis, G.; Kucinskis, V.; Golubickaitė, I.; Skauminas, K.; Saudargiene, A. Glioblastoma Molecular Classification Tool Based on mRNA Analysis: From Wet-Lab to Subtype. *Int J Mol Sci* **2022**, *23*, doi:10.3390/ijms232415875.
275. Verdugo, E.; Puerto, I.; Medina, M.A. An update on the molecular biology of glioblastoma, with clinical implications and progress in its treatment. *Cancer Commun (Lond)* **2022**, *42*, 1083-1111, doi:10.1002/cac2.12361.
276. Salami, R.; Salami, M.; Mafi, A.; Vakili, O.; Asemi, Z. Circular RNAs and glioblastoma multiforme: focus on molecular mechanisms. *Cell Commun Signal* **2022**, *20*, 13, doi:10.1186/s12964-021-00809-9.
277. Tirpe, A.; Streianu, C.; Tirpe, S.M.; Kocijancic, A.; Pirlog, R.; Pirlog, B.; Busuioc, C.; Pop, O.L.; Berindan-Neagoe, I. The Glioblastoma CircularRNAome. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms241914545.
278. Lux, S.; Bullinger, L. Circular RNAs in Cancer. *Adv Exp Med Biol* **2018**, *1087*, 215-230, doi:10.1007/978-981-13-1426-1_17.
279. Peng, D.; Luo, L.; Zhang, X.; Wei, C.; Zhang, Z.; Han, L. CircRNA: An emerging star in the progression of glioma. *Biomed Pharmacother* **2022**, *151*, 113150, doi:10.1016/j.biopha.2022.113150.
280. Xuan, L.; Qu, L.; Zhou, H.; Wang, P.; Yu, H.; Wu, T.; Wang, X.; Li, Q.; Tian, L.; Liu, M., et al. Circular RNA: a novel biomarker for progressive laryngeal cancer. *Am J Transl Res* **2016**, *8*, 932-939.
281. Gruner, H.; Cortes-Lopez, M.; Cooper, D.A.; Bauer, M.; Miura, P. CircRNA accumulation in the aging mouse brain. *Sci Rep* **2016**, *6*, 38907, doi:10.1038/srep38907.
282. Barrett, S.P.; Salzman, J. Circular RNAs: analysis, expression and potential functions. *Development* **2016**, *143*, 1838-1847, doi:10.1242/dev.128074.
283. Yang, L.; Zhou, Y.N.; Zeng, M.M.; Zhou, N.; Wang, B.S.; Li, B.; Zhu, X.L.; Guan, Q.L.; Chai, C. Circular RNA Circ-0002570 Accelerates Cancer Progression by Regulating VCAN via MiR-587 in Gastric Cancer. *Front Oncol* **2021**, *11*, 733745, doi:10.3389/fonc.2021.733745.
284. Zhu, C.; Mao, X.; Zhao, H. The circ_VCAN with radioresistance contributes to the carcinogenesis of glioma by regulating microRNA-1183. *Medicine (Baltimore)* **2020**, *99*, e19171, doi:10.1097/MD.00000000000019171.
285. Li, Y.; Ma, H. circRNA PLOD2 promotes tumorigenesis and Warburg effect in colon cancer by the miR-513a-5p/SIX1/LDHA axis. *Cell Cycle* **2022**, *21*, 2484-2498, doi:10.1080/15384101.2022.2103339.
286. Wu, H.; Cheng, L.; Sun, W.; Zhou, Y. General Characteristics and Promotion Properties of Circular PLOD2 in Patients with Glioma. *World Neurosurg* **2023**, *169*, e147-e156, doi:10.1016/j.wneu.2022.10.079.
287. Zhang, Y.; Zhao, H.; Zhang, L. Identification of the tumor-suppressive function of circular RNA FOXO3 in non-small cell lung cancer through sponging miR-155. *Mol Med Rep* **2018**, *17*, 7692-7700, doi:10.3892/mmr.2018.8830.
288. Wan, L.; Zhang, L.; Fan, K.; Cheng, Z.X.; Sun, Q.C.; Wang, J.J. Circular RNA-ITCH Suppresses Lung Cancer Proliferation via Inhibiting the Wnt/beta-Catenin Pathway. *Biomed Res Int* **2016**, *2016*, 1579490, doi:10.1155/2016/1579490.
289. Li, X.; Wang, J.; Zhang, C.; Lin, C.; Zhang, J.; Zhang, W.; Zhang, W.; Lu, Y.; Zheng, L.; Li, X. Circular RNA circITGA7 inhibits colorectal cancer growth and metastasis by modulating the Ras pathway and upregulating transcription of its host gene ITGA7. *J Pathol* **2018**, *246*, 166-179, doi:10.1002/path.5125.
290. Xiao, M.S.; Ai, Y.; Wilusz, J.E. Biogenesis and Functions of Circular RNAs Come into Focus. *Trends Cell Biol* **2020**, *30*, 226-240, doi:10.1016/j.tcb.2019.12.004.
291. Zhou, Z.; Zheng, X.; Mei, X.; Li, W.; Qi, S.; Deng, Y.; Lei, B. Hsa_circ_0080229 upregulates the expression of murine double minute-2 (MDM2) and promotes glioma tumorigenesis and

- invasion via the miR-1827 sponging mechanism. *Ann Transl Med* **2021**, *9*, 762, doi:10.21037/atm-20-7123.
292. Okholm, T.L.H.; Sathe, S.; Park, S.S.; Kamstrup, A.B.; Rasmussen, A.M.; Shankar, A.; Chua, Z.M.; Fristrup, N.; Nielsen, M.M.; Vang, S., et al. Transcriptome-wide profiles of circular RNA and RNA-binding protein interactions reveal effects on circular RNA biogenesis and cancer pathway expression. *Genome Med* **2020**, *12*, 112, doi:10.1186/s13073-020-00812-8.
293. Kong, P.; Yu, Y.; Wang, L.; Dou, Y.Q.; Zhang, X.H.; Cui, Y.; Wang, H.Y.; Yong, Y.T.; Liu, Y.B.; Hu, H.J., et al. circ-Sirt1 controls NF-kappaB activation via sequence-specific interaction and enhancement of SIRT1 expression by binding to miR-132/212 in vascular smooth muscle cells. *Nucleic Acids Res* **2019**, *47*, 3580-3593, doi:10.1093/nar/gkz141.
294. Su, H.; Tao, T.; Yang, Z.; Kang, X.; Zhang, X.; Kang, D.; Wu, S.; Li, C. Circular RNA cTFRC acts as the sponge of MicroRNA-107 to promote bladder carcinoma progression. *Mol Cancer* **2019**, *18*, 27, doi:10.1186/s12943-019-0951-0.
295. Ou, R.; Mo, L.; Tang, H.; Leng, S.; Zhu, H.; Zhao, L.; Ren, Y.; Xu, Y. circRNA-AKT1 Sequesters miR-942-5p to Upregulate AKT1 and Promote Cervical Cancer Progression. *Mol Ther Nucleic Acids* **2020**, *20*, 308-322, doi:10.1016/j.omtn.2020.01.003.
296. Das, A.; Shyamal, S.; Sinha, T.; Mishra, S.S.; Panda, A.C. Identification of Potential circRNA-microRNA-mRNA Regulatory Network in Skeletal Muscle. *Front Mol Biosci* **2021**, *8*, 762185, doi:10.3389/fmolb.2021.762185.
297. Bai, S.; Wu, Y.; Yan, Y.; Shao, S.; Zhang, J.; Liu, J.; Hui, B.; Liu, R.; Ma, H.; Zhang, X., et al. Construct a circRNA/miRNA/mRNA regulatory network to explore potential pathogenesis and therapy options of clear cell renal cell carcinoma. *Sci Rep* **2020**, *10*, 13659, doi:10.1038/s41598-020-70484-2.
298. Verduci, L.; Strano, S.; Yarden, Y.; Blandino, G. The circRNA-microRNA code: emerging implications for cancer diagnosis and treatment. *Mol Oncol* **2019**, *13*, 669-680, doi:10.1002/1878-0261.12468.
299. Yu, C.Y.; Kuo, H.C. The emerging roles and functions of circular RNAs and their generation. *J Biomed Sci* **2019**, *26*, 29, doi:10.1186/s12929-019-0523-z.
300. Ebbesen, K.K.; Hansen, T.B.; Kjems, J. Insights into circular RNA biology. *RNA Biol* **2017**, *14*, 1035-1045, doi:10.1080/15476286.2016.1271524.
301. Zhao, J.; Jiang, Y.; Zhang, H.; Zhou, J.; Chen, L.; Li, H.; Xu, J.; Zhang, G.; Jing, Z. The SRSF1/circATP5B/miR-185-5p/HOXB5 feedback loop regulates the proliferation of glioma stem cells via the IL6-mediated JAK2/STAT3 signaling pathway. *J Exp Clin Cancer Res* **2021**, *40*, 134, doi:10.1186/s13046-021-01931-9.
302. Yang, E.; van Nimwegen, E.; Zavolan, M.; Rajewsky, N.; Schroeder, M.; Magnasco, M.; Darnell, J.E., Jr. Decay rates of human mRNAs: correlation with functional characteristics and sequence attributes. *Genome Res* **2003**, *13*, 1863-1872, doi:10.1101/gr.1272403.
303. Peng, S.S.; Chen, C.Y.; Xu, N.; Shyu, A.B. RNA stabilization by the AU-rich element binding protein, HuR, an ELAV protein. *EMBO J* **1998**, *17*, 3461-3470, doi:10.1093/emboj/17.12.3461.
304. Kozlov, E.; Shidlovskii, Y.V.; Gilmutdinov, R.; Schedl, P.; Zhukova, M. The role of CPEB family proteins in the nervous system function in the norm and pathology. *Cell Biosci* **2021**, *11*, 64, doi:10.1186/s13578-021-00577-6.
305. Ohgaki, H.; Kleihues, P. The definition of primary and secondary glioblastoma. *Clin Cancer Res* **2013**, *19*, 764-772, doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-3002.
306. Verhaak, R.G.; Hoadley, K.A.; Purdom, E.; Wang, V.; Qi, Y.; Wilkerson, M.D.; Miller, C.R.; Ding, L.; Golub, T.; Mesirov, J.P., et al. Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1. *Cancer Cell* **2010**, *17*, 98-110, doi:10.1016/j.ccr.2009.12.020.
307. Cheng, D.; Wang, J.; Dong, Z.; Li, X. Cancer-related circular RNA: diverse biological functions. *Cancer Cell Int* **2021**, *21*, 11, doi:10.1186/s12935-020-01703-z.
308. Kristensen, L.S.; Hansen, T.B.; Venø, M.T.; Kjems, J. Circular RNAs in cancer: opportunities and challenges in the field. *Oncogene* **2018**, *37*, 555-565, doi:10.1038/onc.2017.361.
309. Morato Torres, C.A.; Zafar, F.; Tsai, Y.C.; Vazquez, J.P.; Gallagher, M.D.; McLaughlin, I.; Hong, K.; Lai, J.; Lee, J.; Chirino-Perez, A., et al. ATTCT and ATTCC repeat expansions in

- the ATXN10 gene affect disease penetrance of spinocerebellar ataxia type 10. *HGG Adv* **2022**, 3, 100137, doi:10.1016/j.xhgg.2022.100137.
310. Siede, D.; Rapti, K.; Gorska, A.A.; Katus, H.A.; Altmuller, J.; Boeckel, J.N.; Meder, B.; Maack, C.; Volkers, M.; Muller, O.J., et al. Identification of circular RNAs with host gene-independent expression in human model systems for cardiac differentiation and disease. *J Mol Cell Cardiol* **2017**, *109*, 48-56, doi:10.1016/j.yjmcc.2017.06.015.
 311. Rochow, H.; Jung, M.; Weickmann, S.; Ralla, B.; Stephan, C.; Elezkurtaj, S.; Kilic, E.; Zhao, Z.; Jung, K.; Fendler, A., et al. Circular RNAs and Their Linear Transcripts as Diagnostic and Prognostic Tissue Biomarkers in Prostate Cancer after Prostatectomy in Combination with Clinicopathological Factors. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21217812.
 312. Abdul Rehman, S.A.; Kristariyanto, Y.A.; Choi, S.Y.; Nkosi, P.J.; Weidlich, S.; Labib, K.; Hofmann, K.; Kulathu, Y. MINDY-1 Is a Member of an Evolutionarily Conserved and Structurally Distinct New Family of Deubiquitinating Enzymes. *Mol Cell* **2016**, *63*, 146-155, doi:10.1016/j.molcel.2016.05.009.
 313. Li, T.; Shao, Y.; Fu, L.; Xie, Y.; Zhu, L.; Sun, W.; Yu, R.; Xiao, B.; Guo, J. Plasma circular RNA profiling of patients with gastric cancer and their droplet digital RT-PCR detection. *J Mol Med (Berl)* **2018**, *96*, 85-96, doi:10.1007/s00109-017-1600-y.
 314. Nielsen, A.F.; Bindereif, A.; Bozzoni, I.; Hanan, M.; Hansen, T.B.; Irimia, M.; Kadener, S.; Kristensen, L.S.; Legnini, I.; Morlando, M., et al. Best practice standards for circular RNA research. *Nat Methods* **2022**, *19*, 1208-1220, doi:10.1038/s41592-022-01487-2.
 315. Hansen, E.B.; Fredsoe, J.; Okholm, T.L.H.; Ulhoi, B.P.; Klingenberg, S.; Jensen, J.B.; Kjems, J.; Bouchelouche, K.; Borre, M.; Damgaard, C.K., et al. The transcriptional landscape and biomarker potential of circular RNAs in prostate cancer. *Genome Med* **2022**, *14*, 8, doi:10.1186/s13073-021-01009-3.
 316. Liu, C.X.; Chen, L.L. Circular RNAs: Characterization, cellular roles, and applications. *Cell* **2022**, *185*, 2390, doi:10.1016/j.cell.2022.06.001.
 317. Boyd, N.H.; Tran, A.N.; Bernstock, J.D.; Etminan, T.; Jones, A.B.; Gillespie, G.Y.; Friedman, G.K.; Hjelmeland, A.B. Glioma stem cells and their roles within the hypoxic tumor microenvironment. *Theranostics* **2021**, *11*, 665-683, doi:10.7150/thno.41692.
 318. Gomez-Oliva, R.; Dominguez-Garcia, S.; Carrascal, L.; Abalos-Martinez, J.; Pardillo-Diaz, R.; Verastegui, C.; Castro, C.; Nunez-Abades, P.; Geribaldi-Doldan, N. Evolution of Experimental Models in the Study of Glioblastoma: Toward Finding Efficient Treatments. *Front Oncol* **2020**, *10*, 614295, doi:10.3389/fonc.2020.614295.
 319. Liu, Y.; Song, J.; Liu, Y.; Zhou, Z.; Wang, X. Transcription activation of circ-STAT3 induced by Gli2 promotes the progression of hepatoblastoma via acting as a sponge for miR-29a/b/c-3p to upregulate STAT3/Gli2. *J Exp Clin Cancer Res* **2020**, *39*, 101, doi:10.1186/s13046-020-01598-8.
 320. Pedersen, H.; Anne Adanma Obara, E.; Elbaek, K.J.; Vitting-Serup, K.; Hamerlik, P. Replication Protein A (RPA) Mediates Radio-Resistance of Glioblastoma Cancer Stem-Like Cells. *Int J Mol Sci* **2020**, *21*, doi:10.3390/ijms21051588.
 321. Wagner, N.; Wagner, K.D. PPAR Beta/Delta and the Hallmarks of Cancer. *Cells* **2020**, *9*, doi:10.3390/cells9051133.
 322. Wang, X.; Wang, G.; Shi, Y.; Sun, L.; Gorczyński, R.; Li, Y.J.; Xu, Z.; Spaner, D.E. PPAR-delta promotes survival of breast cancer cells in harsh metabolic conditions. *Oncogenesis* **2016**, *5*, e232, doi:10.1038/oncsis.2016.41.
 323. Palangat, M.; Anastasakis, D.G.; Fei, D.L.; Lindblad, K.E.; Bradley, R.; Hourigan, C.S.; Hafner, M.; Larson, D.R. The splicing factor U2AF1 contributes to cancer progression through a noncanonical role in translation regulation. *Genes Dev* **2019**, *33*, 482-497, doi:10.1101/gad.319590.118.
 324. Siddaway, R.; Milos, S.; Vadivel, A.K.A.; Dobson, T.H.W.; Swaminathan, J.; Ryall, S.; Pajovic, S.; Patel, P.G.; Nazarian, J.; Becher, O., et al. Splicing is an alternate oncogenic pathway activation mechanism in glioma. *Nat Commun* **2022**, *13*, 588, doi:10.1038/s41467-022-28253-4.

325. Giese, A.; Loo, M.A.; Tran, N.; Haskett, D.; Coons, S.W.; Berens, M.E. Dichotomy of astrocytoma migration and proliferation. *Int J Cancer* **1996**, *67*, 275-282, doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960717)67:2<275::AID-IJC20>3.0.CO;2-9.
326. Oliveira, A.I.; Anjo, S.I.; Vieira de Castro, J.; Serra, S.C.; Salgado, A.J.; Manadas, B.; Costa, B.M. Crosstalk between glial and glioblastoma cells triggers the "go-or-grow" phenotype of tumor cells. *Cell Commun Signal* **2017**, *15*, 37, doi:10.1186/s12964-017-0194-x.
327. Hatzikirou, H.; Basanta, D.; Simon, M.; Schaller, K.; Deutsch, A. 'Go or grow': the key to the emergence of invasion in tumour progression? *Math Med Biol* **2012**, *29*, 49-65, doi:10.1093/imammb/dqq011.
328. Larsson, I.; Dalmo, E.; Elgendy, R.; Niklasson, M.; Doroszko, M.; Segerman, A.; Jornsten, R.; Westermark, B.; Nelander, S. Modeling glioblastoma heterogeneity as a dynamic network of cell states. *Mol Syst Biol* **2021**, *17*, e10105, doi:10.15252/msb.202010105.
329. Hua, S.; Li, H.; Liu, Y.; Zhang, J.; Cheng, Y.; Dai, C. High expression of GALNT7 promotes invasion and proliferation of glioma cells. *Oncol Lett* **2018**, *16*, 6307-6314, doi:10.3892/ol.2018.9498.
330. Yunker, C.K.; Golembieski, W.; Lemke, N.; Schultz, C.R.; Cazacu, S.; Brodie, C.; Rempel, S.A. SPARC-induced increase in glioma matrix and decrease in vascularity are associated with reduced VEGF expression and secretion. *Int J Cancer* **2008**, *122*, 2735-2743, doi:10.1002/ijc.23450.
331. Zhu, C.; Zhao, Y.; Zheng, W. CDC14B is a favorable biomarker for recurrence and prognosis of GBM. *Clin Neurol Neurosurg* **2023**, *227*, 107665, doi:10.1016/j.clineuro.2023.107665.
332. Huang, C.; Chen, D.; Zhu, H.; Lv, S.; Li, Q.; Li, G. LITAF Enhances Radiosensitivity of Human Glioma Cells via the FoxO1 Pathway. *Cell Mol Neurobiol* **2019**, *39*, 871-882, doi:10.1007/s10571-019-00686-4.
333. Xu, W.; Huang, Y.; Mei, Y.; Zhang, Y.; Luo, Q.; Zhu, S.; Peng, L.; Gao, Z.; Liu, Y.; Li, J. High Expression of POGK Predicts Poor Prognosis in Patients with Hepatocellular Carcinoma. *Curr Oncol* **2022**, *29*, 8650-8667, doi:10.3390/curroncol29110682.
334. Hurst, D.R.; Welch, D.R. Metastasis suppressor genes at the interface between the environment and tumor cell growth. *Int Rev Cell Mol Biol* **2011**, *286*, 107-180, doi:10.1016/B978-0-12-385859-7.00003-3.
335. Jakobisiak, M.; Lasek, W.; Golab, J. Natural mechanisms protecting against cancer. *Immunol Lett* **2003**, *90*, 103-122, doi:10.1016/j.imlet.2003.08.005.
336. Chen, W.; Cheng, X.; Wang, X.; Wang, J.; Wen, X.; Xie, C.; Liao, C. Clinical implications of hypoxia-inducible factor-1alpha and caveolin-1 overexpression in isocitrate dehydrogenase-wild type glioblastoma multiforme. *Oncol Lett* **2019**, *17*, 2867-2873, doi:10.3892/ol.2019.9929.
337. Moriconi, C.; Civita, P.; Neto, C.; Pilkington, G.J.; Gumbleton, M. Caveolin-1, a Key Mediator Across Multiple Pathways in Glioblastoma and an Independent Negative Biomarker of Patient Survival. *Front Oncol* **2021**, *11*, 701933, doi:10.3389/fonc.2021.701933.
338. Singh, D.; Kesharwani, P.; Alhakamy, N.A.; Siddique, H.R. Accentuating CircRNA-miRNA-Transcription Factors Axis: A Conundrum in Cancer Research. *Front Pharmacol* **2021**, *12*, 784801, doi:10.3389/fphar.2021.784801.
339. Kim, W.R.; Park, E.G.; Lee, D.H.; Lee, Y.J.; Bae, W.H.; Kim, H.S. The Tumorigenic Role of Circular RNA-MicroRNA Axis in Cancer. *Int J Mol Sci* **2023**, *24*, doi:10.3390/ijms24033050.
340. Zanganeh, S.; Abbasgholinejad, E.; Doroudian, M.; Esmaelizad, N.; Farjadian, F.; Benhabbour, S.R. The Current Landscape of Glioblastoma Biomarkers in Body Fluids. *Cancers (Basel)* **2023**, *15*, doi:10.3390/cancers15153804.
341. Del Bene, M.; Osti, D.; Faletti, S.; Beznoussenko, G.V.; DiMeco, F.; Pelicci, G. Extracellular vesicles: The key for precision medicine in glioblastoma. *Neuro Oncol* **2022**, *24*, 184-196, doi:10.1093/neuonc/noab229.
342. Lane, R.; Simon, T.; Vintu, M.; Solkin, B.; Koch, B.; Stewart, N.; Benstead-Hume, G.; Pearl, F.M.G.; Critchley, G.; Stebbing, J., et al. Cell-derived extracellular vesicles can be used as a biomarker reservoir for glioblastoma tumor subtyping. *Commun Biol* **2019**, *2*, 315, doi:10.1038/s42003-019-0560-x.

343. Marei, H.E.; Althani, A.; Afifi, N.; Hasan, A.; Caceci, T.; Cifola, I.; Caratelli, S.; Sconocchia, G.; D'Agnano, I.; Cenciarelli, C. Glioma extracellular vesicles for precision medicine: prognostic and theragnostic application. *Discov Oncol* **2022**, *13*, 49, doi:10.1007/s12672-022-00514-0.
344. Chen, Y.; Wang, Y.L.; Qiu, K.; Cao, Y.Q.; Zhang, F.J.; Zhao, H.B.; Liu, X.Z. YTHDF2 promotes temozolomide resistance in glioblastoma by activation of the Akt and NF-kappaB signalling pathways via inhibiting EPHB3 and TNFAIP3. *Clin Transl Immunology* **2022**, *11*, e1393, doi:10.1002/cti2.1393.
345. Karnati, H.K.; Panigrahi, M.; Shaik, N.A.; Greig, N.H.; Bagadi, S.A.; Kamal, M.A.; Kapalavayi, N. Down regulated expression of Claudin-1 and Claudin-5 and up regulation of beta-catenin: association with human glioma progression. *CNS Neurol Disord Drug Targets* **2014**, *13*, 1413-1426, doi:10.2174/1871527313666141023121550.
346. Liu, N.; Yang, C.; Bai, W.; Wang, Z.; Wang, X.; Johnson, M.; Wang, W.; Zhang, P.; Yang, H.; Liu, H., et al. CADM2 inhibits human glioma proliferation, migration and invasion. *Oncol Rep* **2019**, *41*, 2273-2280, doi:10.3892/or.2019.7010.
347. Song, J.; Ge, Y.; Dong, M.; Guan, Q.; Ju, M.; Song, X.; Han, J.; Zhao, L. Molecular interplay between EIF4 family and circular RNAs in cancer: Mechanisms and therapeutics. *Eur J Pharmacol* **2023**, *954*, 175867, doi:10.1016/j.ejphar.2023.175867.
348. Xiong, D.; Wu, Y.B.; Jin, C.; Li, J.J.; Gu, J.; Liao, Y.F.; Long, X.; Zhu, S.Q.; Wu, H.B.; Xu, J.J., et al. Elevated FUS/TLS expression is negatively associated with E-cadherin expression and prognosis of patients with non-small cell lung cancer. *Oncol Lett* **2018**, *16*, 1791-1800, doi:10.3892/ol.2018.8816.