



INSTYTUT CHEMII BIOORGANICZNEJ
Polskiej Akademii Nauk

**Identyfikacja i charakterystyka regulatorowych RNA
(sdRNA oraz snoRNA) w glejaku wielopostaciowym –
ich udział w rozwoju i progresji nowotworu**

Mgr Adriana Grabowska

Rozprawa doktorska zrealizowana w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej

Instytut Chemii Bioorganicznej

Polskiej Akademii Nauk

Promotor: dr hab. Katarzyna Rolle, prof. ICH PAN

Poznań, 2024

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania:

Pani dr hab. Katarzynie Rolle, prof. ICHB PAN
dziękuję za wiarę we mnie, przekazaną wiedzę i wsparcie podczas realizacji niniejszej
rozprawy oraz okazaną życzliwość.

Zespołowi Zakładu Neuroonkologii Molekularnej
dr Julii Misiorek,
dr. inż. Pawłowi Głodowiczowi,
dr. Konradowi Kuczyńskiemu,
dr. Dariuszowi Wawrzyniakowi
dziękuję za cenne rady, przyjacielską atmosferę i chwile radości,
które umilały każdy dzień w pracy.

Panu prof. dr. hab. Janowi Barciszewskiemu,
dr. Marcinowi Sajkowi,
dr. Łukaszowi Przybyłowi,
dr. Michałowi Predeckiemu,
mgr Alicji Rzepczak,
pani Małgorzacie Dąbkiewicz
dziękuję za wkład w mój rozwój podczas doktoratu, cenne wskazówki oraz okazaną
życzliwość i wsparcie.

mgr Julii-Latowskiej-Łysiak
dziękuję za wspólną podróż od pierwszego dnia studiów, codzienne motywowanie do
działania i ogrom przyjacielskiego wsparcia.

dr Żanecie Zarębskiej,
dr Małgorzacie Grabowskiej
dziękuję za przyjaźń, która zrodziła się podczas realizacji doktoratów, a także okazane
wsparcie merytoryczne i duchowe.

Moim przyjaciółkom Klaudii, Agacie i Oli
dziękuję za dzielenie smutków i radości oraz nieocenioną przyjaźń.

Rodzicom, Siostrze i Tomkowi
dziękuję za bezwarunkową wiarę we mnie i pomoc w podejmowaniu życiowych wyborów.

Stasiowi
dziękuję za to, że jest moją inspiracją każdego dnia.

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 ośrodkowego układu nerwowego (OUN)	18
1.2. Ogólna charakterystyka glejaka wielopostaciowego (GBM)	20
1.2.1. Klasyfikacja i epidemiologia	20
1.2.2. Symptomy i diagnostyka	21
1.2.3. Leczenie	22
1.2.4. Profil molekularny GBM	24
1.2.5. Klasyfikacja GBM	26
1.2.6. Mikrośrodowisko nowotworu (TME) i komórki macierzyste GBM (GSC)	28
1.2.7. Środowisko hipoksyjne w GBM	29
1.2.8. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) w GBM	30
1.3. Niekodujące RNA (ncRNA)	32
1.3.1. NcRNA jako potencjalne biomarkery GBM	33
1.3.1.1. Wolnokrążące ncRNA w płynach ustrojowych	33
1.3.1.2. NcRNA obecne w EV w płynach ustrojowych	34
1.3.2. Charakterystyka małych jąderkowych RNA (snoRNA)	35
1.3.2.1. Biogeneza snoRNA	35
1.3.2.2. Funkcje snoRNP	36
1.3.2.3. SnoRNA w nowotworach	38
1.3.3. Krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (sdrRNA)	40
1.3.3.1. Potencjalne mechanizmy powstawania sdrRNA	40
1.3.3.1.1. <i>Mechanizm powstawania zależny od DICER</i>	40
1.3.3.1.2. <i>Mechanizm powstawania zależny od AGO2</i>	41
1.3.3.1.3. <i>Inne mechanizmy biogenezy krótkich RNA</i>	41
1.3.3.2. Potencjalne funkcje sdrRNA	42
1.3.3.3. SdrRNA w nowotworach	43

2. Materiały i metody	45
2.1. Odczynniki chemiczne oraz gotowe zestawy odczynników	45
2.2. Oligonukleotydy	47
2.3. Analiza wyników sekwencjonowania RNA	50
2.4. Tkanki oraz próbki krwi pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM	51
2.5. Hodowle komórkowe	53
2.6. Izolacja całkowitego RNA	54
2.7. Oczyszczanie całkowitego RNA z zanieczyszczeń DNA	55
2.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym	55
2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji	56
2.10. Reakcja poliadenylacji i odwrotna transkrypcja	56
2.11. Frakcjonowanie subkomórkowe RNA	57
2.12. Izolacja frakcji RNA związanych z chromatyną	59
2.13. Frakcjonowanie subkomórkowe białek	60
2.14. Indukcja hipoksji	60
2.15. Magnetyczna separacja frakcji komórek macierzystych GBM (GSC)	60
2.16. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)	61
2.17. Manipulacja poziomem białka FUS	63
2.18. Transfekcja komórek GBM plazmidem do nadekspresji genu <i>FUS</i>	63
2.19. Analiza Western Blot	64
2.20. Fluorescencyjna hybrydyzacja <i>in situ</i> (FISH)	66
2.21. Izolacja całkowitego RNA z plazmy krwi pacjentów z GBM	67
2.22. Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) z pożywki hodowlanej	68
2.23. Immunoprecypitacja z zastosowaniem „cross-linking”	69
2.24. Analizy <i>in silico</i>	71
2.25. Różnicowa analiza poziomu sdrRNA i snoRNA EV wyizolowanych z plazmy krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM	71
2.26. Analiza statystyczna wyników	73
3. Cel pracy	74
4. Wyniki	75

4.1. Ocena poziomu cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorów snoRNA w GBM	75
4.1.1. Analiza wyników sekwencjonowania RNA	75
4.1.2. Walidacja wybranych cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorów snoRNA w tkankach GBM	80
4.2. Potencjał diagnostyczny wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA	83
4.2.1. Ocena poziomu wybranych sdRNA oraz snoRNA w podtypach GBM	83
4.2.2. Analiza poziomu wybranych sdRNA i snoRNA w EV	84
4.2.3. Analiza poziomu wybranych sdRNA oraz snoRNA w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM	85
4.2.4. Analiza bioinformatyczna obecności sdRNA i snoRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM	87
4.3. Charakterystyka wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA	92
4.3.1. Analiza struktur drugorzędowych SNORA77 oraz SNORA81	92
4.3.2. Ocena korelacji między 1_707-5p oraz 1_707-3p a ich prekursorem SNORA77	95
4.3.3. Ocena korelacji między hsa-miR-1248 a jej potencjalnymi prekursorami	96
4.3.4. Ocena zależności między snoRNA a ekspresją „genów gospodarza”	99
4.3.5. Ocena tkankowo-zależnej specyficzności występowania wybranych sdRNA oraz snoRNA w liniach komórkowych GBM i nie-GBM	101
4.3.6. Określenie subkomórkowo-zależnej specyficzności występowania wybranych sdRNA oraz snoRNA	102
4.3.7. Poziom wybranych sdRNA oraz snoRNA w warunkach niedoboru tlenu	107
4.3.8. Poziom wybranych sdRNA oraz snoRNA we frakcji komórek macierzystych GBM (GSC)	110
4.4. Interakcje sdRNA oraz snoRNA z wybranymi białkami	112
4.4.1. Ocena poziomu wybranych sdRNA i snoRNA w komórkach GBM z delecją genu <i>FUS</i>	112

4.4.2.	Ocena poziomu wybranych sdRNA i snoRNA w komórkach GBM ze zwiększonym poziomem białka FUS	113
4.4.3.	Analiza <i>in silico</i> miejsc wiązania snoRNA oraz sdRNA z wybranymi białkami	118
4.4.4.	Charakterystyka białek potencjalnie wiążących badane snoRNA	120
4.4.5.	Ocena zależności między transkryptami wybranych białek a cząsteczkami snoRNA i sdRNA	122
4.4.6.	Ocena wiązania cząsteczek snoRNA oraz sdRNA z wybranymi białkami za pomocą metody immunoprecypitacji	125
4.4.6.1.	Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA z białkiem FUS	125
4.4.6.2.	Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA oraz sdRNA z białkiem DROSHA	127
4.4.6.3.	Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA z białkiem AGO2	128
5.	Dyskusja	131
5.1.	Ocena sygnatury sdRNA oraz ich prekursorów w GBM	131
5.1.1.	Zróźnicowany poziom sdRNA w GBM	131
5.1.2.	Zróźnicowany poziom snoRNA w GBM	132
5.2.	Potencjalna biogeneza sdRNA	133
5.2.1.	Analiza struktur drugorzędowych SNORA77 i SNORA81	134
5.2.2.	Potencjalne białka biorące udział w przetwarzaniu snoRNA	134
5.3.	Potencjalne funkcje wybranych sdRNA i snoRNA w GBM	138
5.3.1.	Potencjalne funkcje sdRNA 1_707-5p, 1_707-3p i hsa-miR-1248 w GBM	138
5.3.2.	Potencjalne funkcje SNORA77 i SNORA81 w GBM	141
5.4.	Potencjał prognostyczny i diagnostyczny sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w GBM	144
5.4.1.	Udział badanych sdRNA i snoRNA w podtypowaniu GBM	144
5.4.2.	SdRNA i snoRNA w komunikacji międzykomórkowej w GBM	145
5.4.3.	SdRNA i snoRNA jako potencjalne biomarkery GBM	145
6.	Wnioski i perspektywy	148
7.	Bibliografia	150

Wykaz prac naukowych

- Dorna D., **Grabowska A.**, Paluszczak J. (2023). Natural products modulating epigenetic mechanisms by affecting histone methylation/demethylation: Targeting cancer cells. *British journal of pharmacology*. DOI: 10.1111/bph.16237; MEiN = 140
- Latowska J.*, **Grabowska A.***, Zarębska 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. DOI: 10.3390/ijms21197001; MEiN = 140
- Tymoniuk B., Zmora P., Latowska J., **Grabowska A.**, Ciesiołka A., Joachimiak P., Figura G., Borowiec M., Rolle K., Handschuh L., Fiszer A. (2021). Genetic tests based on the RT-PCR reaction in the diagnostics of SARS-CoV-2 infection. *Przegląd epidemiologiczny*, 75(1), 14–26. DOI: 10.32394/pe.75.02

Prace przesłane do recenzji:

- Latowska-Łysiak J.*, Zarębska 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.
- Zarębska 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., Zarębska 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

AGO2	ang. <i>Argonaute-2</i>
APS	nadsiarczan amonu
ATP	trifosforan adenozyiny (ang. <i>adenosine triphosphate</i>)
ATRX	czynnik transkrypcyjny (ang. <i>alpha-thalassemia syndrome</i>)
BBB	bariera krew-mózg (ang. <i>Blood-brain barrier</i>)
BRAF	ang. <i>v-Raf Murine Sarcoma Viral Oncogene Homolog B1</i>
CAR-T	chimeryczny receptor antygenowy limfocytów T (ang. <i>Chimeric Antigen Receptor T-cell</i>)
CASP8	kaspaza 8 (ang. <i>Caspase 8</i>)
CD133	klastrowy marker różnicowania 33 (ang. <i>Cluster of Differentiation 33</i>)
CD81	klastrowy marker różnicowania 81 (ang. <i>Cluster of Differentiation 81</i>)
CDK4	kinaza zależna od cykliny 4 (ang. <i>Cyclin-Dependent Kinase 4</i>)
CDKN2A/B	inhibitor kinazy cyklino-zależna 2 A/B (ang. <i>cyclin dependent kinase inhibitor 2A/2B</i>)
CIC	białko represorowe (ang. <i>Capicua Transcriptional Repressor</i>)
circRNA	koliste RNA (ang. <i>circular RNA</i>)
CLIC1	ang. <i>Chloride Intracellular Channel 1</i>
CT	tomografia komputerowa (ang. <i>Computed Tomography</i>)
CTC	krążące komórki nowotworowe (ang. <i>Circulating Tumor Cells</i>)
DGE	różnicowa analiza ekspresji (ang. <i>Differential Gene Expression</i>)
DNA	kwasy deoksyrybonukleinowe (ang. <i>deoxyribonucleic acid</i>)
DR4	receptor śmierci 4 (ang. <i>Death Receptor 4</i>)
EDTA	kwas wersenowy
EGFR	receptor naskórkowego czynnika wzrostu (ang. <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>)
EMT	przejście nabłonkowo-mezenchymalne (ang. <i>Epithelial-Mesenchymal Transition</i>)
EV	pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (ang. <i>Extracellular Vesicles</i>)

FBS	plodowa surowica bydlęca
FDA	ang. <i>Food and Drug Administration</i>
FGFR1	receotor czynnika wzrostu fibroblastów 1 (ang. <i>Fibroblast Growth Factor Receptor 1</i>)
FISH	fluorescencyjna hybrydyzacja in situ (ang. <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i>)
FUBP1	ang. <i>Far Upstream Element Binding Protein</i>
FUS	ang. <i>Fused in Sarcoma</i>
GATA	ang. <i>GATA binding protein</i>
GBM	glejak wielopostaciowy (ang. <i>Glioblastoma</i>)
GSC	komórki macierzyste glejaka (ang. <i>Glioblastoma Stem Cells</i>)
HIF1α/HIF2α	czynnik indukowany hipoksją 1 α /2 α (ang. <i>Hypoxia-Induced Factor 1α/2α</i>)
IDH	dehydrogenaza izocytrynianianowa (ang. <i>isocitrate dehydrogenase</i>)
KRAS	ang. <i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
LITT	Laserowa Termoterapia Śródmiąższowa (ang. <i>Laser Interstitial Thermal Therapy</i>)
lncRNA	długie niekodujące RNA (ang. <i>long non-coding RNA</i>)
MDSC	komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (ang. <i>Myeloid-Derived Suppressor Cells</i>)
MFE	minimalna swobodna energia (ang. <i>Minimum Free Energy</i>)
MgCl₂	chlerek magnezu
MGMT	metylotransferaza DNA O6-metyloguaniny (ang. <i>O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase</i>)
miRNA	mikro RNA (ang. <i>micro RNA</i>)
MN1	ang. <i>Meningioma 1</i>
MRI	rezonans magnetyczny (ang. <i>Magnetic Resonance Imaging</i>)
mRNA	matrycowy RNA (ang. <i>messenger RNA</i>)
NaCl	chlerek sodu
ncRNA	niekodujące RNA (ang. <i>non-coding RNA</i>)
NES	nestyna (ang. <i>nestin</i>)

NF1	neurofibromina 1 (ang. <i>Neurofibromin 1</i>)
NK	ang. <i>Natural Killer Cells</i>
NTA	analiza śledzenia nanocząstek (ang. <i>Nanoparticle Tracking Analysis</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>)
PDGFRA	receptor alfa czynnika wzrostu pochodzącego z płytek krwi (ang. <i>Platelet-Derived Growth Factor Receptor Alpha</i>)
PD-L1	ligand receptora programowanej śmierci 1 (ang. <i>Programmed Death-Ligand 1</i>)
PET	pozytonowa tomografia emisyjna (ang. <i>Positron Emission Tomography</i>)
PIK3CA	katalityczna podjednostka alfa 3-kinazy fosfatydyloinozytolu-4,5-bifosforanu (ang. <i>Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate 3-kinase catalytic subunit alpha</i>)
piRNA	ang. <i>piwi-interacting RNA</i>
pRb	ang. <i>Retinoblastoma Protein</i>
PRKCA	kinaza białkowa C alfa (ang. <i>Protein Kinase C Alpha</i>)
PTEN	ang. <i>Phosphatase and Tensin Homolog</i>
qPCR	ilościowa reakcja łańcuchowa polimerazy (ang. <i>quantitative Polymerase Chain Reaction</i>)
RISC	ang. <i>RNA-Induced Silencing Complex</i>
RNA	kwasy rybonukleinowe (ang. <i>ribonucleic acid</i>)
ROS	reaktywne formy tlenu (ang. <i>Reactive Oxygen Species</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>)
RTK	receptor kinazy tyrozynowej (ang. <i>Receptor Tyrosine Kinase</i>)
scaRNA	ang. <i>small Cajal body-specific RNA</i>
sdRNA	krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (ang. <i>sno-derived RNA</i>)
SDS	dodecylosiarczan sodu
SLC44A1	ang. <i>Solute Carrier Family 44 Member 1</i>

snoRNA	mały jąderkowy RNA (ang. <i>small nucleolar RNA</i>)
snoRNP	małe jąderkowe rybonukleoproteiny (ang. <i>small nucleolar ribonucleoprotein</i>)
snRNA	mały jądrowy RNA (ang. <i>small nuclear RNA</i>)
TAM	makrofagi związane z nowotworem (ang. <i>Tumor-Associated Macrophages</i>)
TCGA	TCGA (ang. <i>The Cancer Genome Atlas</i>)
TEM	transmisyjna mikroskopia elektronowa (ang. <i>Transmission Electron Microscopy</i>)
TEMED	N,N,N',N'-tetrametyloetylenodiamina
TERT	odwrotna transkryptaza telomerazy (ang. <i>telomerase reverse transcriptase</i>)
TME	mikrośrodowisko nowotworu (ang. <i>Tumor Microenvironment</i>)
TMZ	temozolomid (ang. <i>Temozolomide</i>)
Tris	hydroksymetyloaminometan
tRNA	transportujący RNA (ang. <i>transfer RNA</i>)
TSC	ang. <i>Tuberous Sclerosis Complex</i>
VEGF	czynnik wzrostu śródbłónka naczyniowego (ang. <i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>)
VIM	wimentyna (ang. <i>vimentin</i>)
WHO	Światowa Organizacja Zdrowia (ang. <i>World Health Organizartion</i>)

Streszczenie

Glejak wielopostaciowy (GBM) to najbardziej złośliwy nowotwór mózgu u dorosłych. Ze względu na wysoką oporność tego nowotworu na leczenie, mediana przeżycia pacjentów wciąż pozostaje niska, a jego wznowa jest niemal pewna. Z tego względu, kluczowe znaczenie ma zrozumienie mechanizmów patofizjologicznych leżących u podłoża tego nowotworu. Jedną z głównych przyczyn agresywnego charakteru GBM jest wysoka heterogenność, spowodowana obecnością zróżnicowanych populacji komórek nowotworowych, w tym komórek macierzystych GBM (GSC). GSC odgrywają kluczową rolę w rozwoju guza, jego różnicowaniu i mechanizmach odpowiedzialnych za inwazję. Wraz z progresją, GBM nabywa oporności na leczenie, co ma ścisły związek z mikrośrodowiskiem guza, które wykazuje właściwości immunosupresyjne, pomagając komórkom nowotworowym uniknąć odpowiedzi układu odpornościowego.

W celu poszukiwania nowych strategii diagnostycznych, a także terapeutycznych GBM, coraz więcej badań skupia się na poznaniu roli niekodujących RNA w rozwoju i progresji tego nowotworu. Doniesienia dotyczące małych jąderkowych RNA (snoRNA), a także pochodzących z nich cząsteczek sdRNA w GBM są nieliczne. Z tego względu, niniejsza rozprawa doktorska obejmuje badania skupiające się na identyfikacji i charakterystyce tych cząsteczek w GBM. Analiza wyników sekwencjonowania, a także przeprowadzona walidacja pozwoliły na selekcję kandydatów sdRNA potencjalnie zaangażowanych w rozwój tego nowotworu. Dalsza ocena poziomu wybranych kandydatów w warunkach hipoksji, a także frakcji GSC, sugeruje odmienny udział badanych cząsteczek w procesie nowotworzenia. Uzyskane wyniki potwierdziły również obecność badanych cząsteczek w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV), co wskazywać może na ich potencjalną rolę w komunikacji międzykomórkowej. Z kolei immunoprecypitacja białek wiążących wybrane sdRNA, jak i snoRNA pozwoliła na wstępną ocenę ich mechanizmu działania.

Biorąc pod uwagę, że biogeneza cząsteczek sdRNA nie jest znana, analiza struktur drugorzędowych wybranych snoRNA pozwoliła na ocenę lokalizacji obecnych w nich sekwencji sdRNA. Natomiast analizy oparte o zmiany poziomu białka FUS, a także immunoprecypitację białek zaangażowanych w przetwarzanie prekursorowych snoRNA, pozwoliły określić ich potencjalny udział w powstawaniu sdRNA.

Nieodzownym elementem badań nad nowotworami staje się również poszukiwanie biomarkerów, szczególnie tych obecnych w plazmie krwi pacjentów. W niniejszej pracy potwierdzono obecność badanych cząsteczek w plazmie pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, sugerując ich udział we wznowie nowotworu.

Przedstawione wyniki potwierdziły, że poziom zdecydowanej większości zidentyfikowanych cząsteczek sdRNA, jak i ich prekursorowych snoRNA jest podwyższony w GBM, co sugeruje ich udział w procesie nowotworzenia. Wstępna analiza pozwoliła również na ocenę potencjalnego mechanizmu powstawania wybranych sdRNA, a także ich potencjalnej roli w tym nowotworze. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy pozwalają lepiej zrozumieć mechanizmy molekularne odpowiedzialne za rozwój i progresję GBM w oparciu o nowe klasy regulatorowych RNA – snoRNA i powstające z nich sdRNA, co w przyszłości może pomóc w opracowaniu skutecznych metod leczenia, a także lepszej diagnostyki pacjentów.

Abstract

Glioblastoma (GBM) is the most malignant brain tumor in adults. Due to the high resistance of this cancer to treatment, the median survival of patients remains low, and its recurrence is almost certain. Therefore, it is crucial to understand the pathophysiological mechanisms underlying this cancer. One of the main reasons for the aggressive nature of GBM is its high heterogeneity, caused by the presence of diverse tumor cell populations, including GBM stem cells (GSCs). GSCs play a key role in tumor development, differentiation, and mechanisms responsible for invasion. As GBM progresses, it becomes resistant to treatment, which is closely related to the tumor microenvironment. The tumor microenvironment has immunosuppressive properties, helping cancer cells evade the immune system's response.

In order to search for new diagnostic and therapeutic strategies for GBM, more research is focused on understanding the role of non-coding RNAs in the development and progression of this cancer. Reports on small nucleolar RNAs (snoRNAs) and sno-derived RNAs (sdRNAs) in GBM are scarce. Therefore, this dissertation covers research focusing on identifying and characterizing these molecules in GBM. The analysis of the sequencing results and the performed validation allowed for the selection of sdRNA candidates potentially involved in the development of this cancer. Further assessment of the level of selected candidates in hypoxic conditions and the GSC fraction suggests a different involvement of both snoRNAs and sdRNAs in the carcinogenesis process. The obtained results also confirmed the presence of these molecules in extracellular vesicles (EVs), which may indicate their potential role in intercellular communication. In turn, immunoprecipitation of proteins binding selected sdRNAs and snoRNAs allowed for a preliminary assessment of their mechanism of action.

Given the unknown biogenesis of sdRNA molecules, the analysis of the secondary structures of selected snoRNAs was conducted, to assess the location of the sdRNA sequences present in them. However, more in-depth analyses, including those based on changes in FUS protein levels, as well as immunoprecipitation of proteins involved in the processing of precursor snoRNAs, were also performed. These analyses provided valuable insights into the potential involvement of these molecules in the formation of sdRNAs, further strengthening the scientific basis of this research.

The search for biomarkers, especially those present in patients' plasma, is also becoming an indispensable element of cancer research. This study confirmed the presence of the tested molecules in the plasma of patients diagnosed with GBM, suggesting their involvement in cancer recurrence.

The presented results not only confirmed the increased levels of the vast majority of identified sdRNA molecules, as well as their precursor snoRNAs, in GBM, suggesting their involvement in the carcinogenesis process, but also provided a preliminary analysis of the potential biogenesis of selected sdRNAs, as well as their potential role in this cancer. These findings significantly contribute to the understanding of the molecular mechanisms responsible for the development and progression of GBM, particularly based on new classes of regulatory RNAs - snoRNAs and sdRNAs derived from them. This understanding could potentially pave the way for the development of more effective treatment methods and improved diagnostics for patients in the future.

1. Wprowadzenie

1.1. Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN)

Nowotwory ośrodkowego układu nerwowego (OUN, ang. *Central Nervous System*), choć u dorosłych stanowią zaledwie niecałe 2 % zachorowań na nowotwory złośliwe, powodują znaczną śmiertelność w każdym wieku. Stanowią one najczęstsze nowotwory diagnozowane u dzieci w wieku do 14 lat i drugie pod względem częstości nowotwory diagnozowane u młodzieży. Mimo wieloletnich badań nad ich etiologią, nie wykryto żadnego istotnego czynnika ryzyka, który mógłby być przypisany do znacznej liczby przypadków. Jedynym wspólnym czynnikiem ryzyka jest ekspozycja na duże dawki promieniowania jonizującego [1, 2].

W 2021 roku Światowa Organizacja Zdrowia (WHO, ang. *World Health Organization*) opublikowała piąte wydanie Klasyfikacji Nowotworów OUN w ramach międzynarodowego standardu klasyfikacji nowotworów mózgu i rdzenia kręgowego [3]. Nowotwory te obejmują ponad 100 typów, charakteryzują się wysoką złożonością histologiczną i wykazują wiele dobrze poznanych cech charakterystycznych dla nowotworu. Najnowsze kryteria klasyfikacji kładą większy nacisk na rolę czynników molekularnych w diagnostyce nowotworów OUN. Najczęstszymi nowotworami złośliwymi OUN u dorosłych są glejaki, wywodzące się z komórek glejowych. W Europie każdego roku diagnozuje się 27 000 nowych przypadków tych nowotworów.

Ogólna klasyfikacja nowotworów pochodzenia glejowego u dorosłych wraz z profilem mutacji genów czy zmian molekularnych została przedstawiona w Tabeli 1. W Tabeli 2 natomiast przedstawiono porównanie nomenklatury glejaków rozsianych u dorosłych z poprzedniej wersji Klasyfikacji Nowotworów OUN z 2016 roku oraz wspomnianej wcześniej najnowszej wersji z 2021 roku [2, 4].

Tabela 1. Ogólna klasyfikacja nowotworów pochodzenia glejowego u dorosłych. Opracowano na podstawie [5].

Guz	Stopień złośliwości według WHO	Profil mutacji genów /zmian molekularnych	Źródło
Glejaki rozsiane typu dorosłego			
Gwiaździatek	II, III, IV	Mutacje w genach <i>IDH</i> , <i>TP53</i> , delecja w <i>ATRX</i> , duplikacja w <i>CDKN2A/B</i>	[6]
Skąpodrzewiak	II, III	Mutacja w genie <i>IDH</i> z kodelecją 1p/19q, delecja promotora <i>TERT</i> , mutacje w <i>CIC</i> , <i>FUBP1</i> , <i>NOTCH1</i>	[7]
Glejak wielopostaciowy (GBM)	IV	Brak mutacji w genie <i>IDH</i> , mutacja promotora <i>TERT</i> , dodatkowa kopia chromosomu 7 i utrata ramienia chromosomu 10, amplifikacja <i>EGFR</i>	[8]
Ograniczone glejaki astrocytarne			
Gwiaździatek włosowatokomórkowy	I	Fuzja <i>KIAA1549-BRAF</i> , mutacje w genach <i>BRAF</i> , <i>NF1</i> , <i>KRAS</i>	[9]
Gwiaździatek o wysokim stopniu złośliwości z cechami piloidalnymi	III, IV	Zmiany w szlaku MAPK, zmiany w <i>NF1</i> , mutacja w <i>ATRX</i> , delecja w <i>CDKN2A/B</i>	[10]
Żółtakogwiaździatek pleomorficzny	II, III	Mutacje w <i>pTERT</i> , delecje w genach <i>BRAF</i> , <i>CDKN2A/B</i>	[11]
Gwiaździatek podwyżściółkowy olbrzymiokomórkowy	I	Mutacje w genach <i>TSC1</i> , <i>TSC2</i>	[12]
Glejak struniakowy	I	Mutacja w <i>PRKCA</i>	[13]
Gwiaździatek zarodkowy	I - IV	Mutacja w <i>MNI</i> , aberracje w chromosomie X	[14]
Guzy glioneuronalne			
Zwojakoglejak	I	Mutacja w <i>BRAF</i>	[15]
Brodawkowaty nowotwór glioneuronalny	I	Fuzja <i>SLC44A1-PRKCA</i>	[16]
Guz glioneuronalny tworzący rozety	I	Mutacje w genach <i>FGFR1</i> , <i>PIK3CA</i> , <i>NF1</i>	[17]

Śluzowaty nowotwór glioneuronalny	I	Mutacja w <i>PDGFRA</i>	[18]
--------------------------------------	---	-------------------------	------

Tabela 2. Porównanie nomenklatury glejaków rozsianych u dorosłych według Klasyfikacji Nowotworów OUN z 2016 roku i 2021 roku. Opracowano na podstawie [5].

Klasyfikacja Nowotworów OUN według WHO z 2016 roku	Klasyfikacja Nowotworów OUN według WHO z 2021 roku
Rozlany gwiaździak, mutant IDH, stopień II	Gwiaździak, mutant IDH, stopień II
Gwiaździak anaplastyczny, mutant IDH, stopień III	Gwiaździak, mutant IDH, stopień III
Glejak wielopostaciowy, mutant IDH, stopień IV (glejak wtórny)	Gwiaździak, mutant IDH, stopień IV
Rozlany gwiaździak, typ dziki IDH, stopień II	
Gwiaździak anaplastyczny, typ dziki IDH, stopień III	Glejak wielopostaciowy, typ dziki IDH, stopień IV
Glejak wielopostaciowy, typ dziki IDH, stopień IV (glejak pierwotny)	
Skąpodrzewiak, mutant IDH i kodelecja 1p/19q, stopień II	Skąpodrzewiak, mutant IDH i kodelecja 1p/19q, stopień II
Anaplastyczny skąpodrzewiak, mutant IDH i kodelecja 1p/19q, stopień III	Skąpodrzewiak, mutant IDH i kodelecja 1p/19q, stopień III

1.2. Ogólna charakterystyka glejaka wielopostaciowego (GBM)

1.2.1. Klasyfikacja i epidemiologia

Glejak wielopostaciowy (GBM, ang. *glioblastoma*) należy do najbardziej złośliwych z nowotworów OUN i stanowi 50 % wszystkich glejaków. Pomimo leczenia mediana przeżycia pacjentów wynosi średnio 15 miesięcy od postawienia diagnozy. Według najnowszej klasyfikacji, mianem GBM określa się wszystkie nowotwory wywodzące się z komórek glejowych bez mutacji w genie kodującym IDH (ang. *isocitrate dehydrogenase*) [3, 19]. Komórki glejowe, składające się z mikrogleju, astrocytów i oligodendrocytów, stanowią nawet ponad 50 % masy mózgu u ludzi i pełnią szereg funkcji, od odżywiania komórek nerwowych, przez syntezę enzymów istotnych dla wytwarzania neuroprzekazników, po tworzenie osłonek

mielinowych aksonów czy współtworzenie bariery krew-mózg (BBB, ang. *Blood-Brain Barrier*) [20].

GBM jest znany ze swojej dużej agresywności i inwazyjności, ale przeważnie pozostaje zlokalizowany w mózgu, a przerzuty pozaczaszkowe występują niezwykle rzadko, dotykają jedynie 0,5 – 2 % pacjentów i zazwyczaj obejmują takie miejsca jak płuca, kości czy wątroba [21-23].

Częstość występowania GBM wynosi od 3,19 przypadków na 100 000 osób ([24, 25]) do 4,17 przypadków na 100 000 osób [26]. Wiek jest ważnym czynnikiem w rozwoju chorób nowotworowych. W przypadku GBM, zdecydowana większość przypadków zachorowań występuje u osób powyżej 40 roku życia, a prawie 50 % pacjentów osiąga wiek powyżej 65 lat [27]. Badania wskazują również na większą częstość występowania GBM u mężczyzn z uwagi na ochronny wpływ żeńskich hormonów płciowych na rozwój GBM [28]. Jedynym uznanym czynnikiem ryzyka GBM jest narażenie na wysokie dawki promieniowania jonizującego. Badania epidemiologiczne wykazały również związek między zwiększonym ryzykiem zachorowania na GBM a otyłością lub wysokim wzrostem. Nie odnotowano związku między paleniem papierosów lub narażeniem na metale ciężkie a większym ryzykiem rozwoju GBM, z kolei narażenie na pestycydy zwiększało chemiooporność u pacjentów [19].

1.2.2. Symptomy i diagnostyka

Obraz kliniczny pacjentów zależy od lokalizacji i wielkości guza w momencie rozpoznania. U pacjentów często występują objawy zwiększonego ciśnienia wewnątrzczaszkowego, w tym ból głowy i nudności, utrata masy ciała czy ogniskowe lub postępujące ubytki neurologiczne, w tym deficyty motoryczne, splątanie oraz zaburzenia widzenia i mowy [29]. U 25 % pacjentów we wczesnym do 50 % pacjentów w późniejszym stadium choroby występują również napady padaczkowe [30].

Tomografia komputerowa (CT, ang. *Computed Tomography*) lub rezonans magnetyczny ze wzmocnieniem kontrastowym (MRI, ang. *Magnetic Resonance Imaging*) są najpowszechniej stosowanymi technikami obrazowania diagnostycznego GBM [31]. W przypadku wysoce swoistego obrazowania można rozważyć pozytonową tomografię emisyjną (PET, ang. *Positron Emission Tomography*) lub innowacyjne „obrazowanie celowane immunologicznie”, w którym przeciwciała o wysokiej swoistości łączą się z danym celem na powierzchni komórki nowotworowej, a następnie do obrazowania wykorzystuje się PET [32]. W badaniu MRI prawie wszystkie GBM charakteryzują się masą o nieregularnym kształcie z

wzmocnieniem kontrastu na krawędziach i hipointensywnym środkiem martwicy. W około 13 % przypadków, GBM może objawiać się jako zmiana wielogniskowa (więcej niż dwie zmiany, w tym rozsiane w oponach mózgowo-rdzeniowych), odległa (druga zmiana nie sąsiadująca ze zmianą pierwotną) lub rozlana [33]. GBM najczęściej zlokalizowany jest w górnej części mózgu (przestrzeni nadnamiotowej) (ponad 85 %) lub w płacie czołowym (25 %). Najrzadziej występuje w pniu mózgu, rdzeniu kręgowym czy mózdzku (< 5 %) [34]. Morfologicznie główne cechy diagnostyczne GBM stanowią atypia jądrowa, pleomorfizm komórkowy, wysoka aktywność mitotyczna, proliferacja mikronaczyń i nekroza [35].

1.2.3. Leczenie

Protokół Stuppa stał się standardem postępowania w leczeniu GBM od czasu jego publikacji w 2005 roku i doprowadził do znacznej poprawy przeżycia pacjentów. Standardowe leczenie GBM obejmuje resekcję neurochirurgiczną połączoną z równoczesną radio- i chemioterapią [36]. W przypadku radioterapii rozpoczynanej od czterech do sześciu tygodni po operacji lub wcześniej, w większości przypadków odpowiednia jest dawka od 50 do 60 Gy, pozwalająca wyeliminować zmiany mikroskopowe po resekcji guza. Standardowym zatwierdzonym środkiem chemioterapeutycznym w leczeniu GBM jest temozolomid (TMZ, ang. *Temozolomide*), który stosunkowo szybko przenika przez barierę krew-mózg i doprowadza do apoptozy komórek zlokalizowanych w mózgu [31]. Jednakże, GBM często nabiera lekooporności w trakcie chemioterapii. Podstawowym mechanizmem oporności na TMZ jest indukcja ekspresji metylotransferazy DNA O6-metyloguaniny (MGMT, ang. *O-6-Methylguanine-DNA Methyltransferase*) odpowiedzialnej za naprawę uszkodzeń DNA wywołanych przez chemioterapeutyk [37].

Pomimo stosowania przyjętej strategii terapeutycznej, wznowa GBM jest nadal niemal pewna ze względu na wysoką oporność tego nowotworu na chemioterapeutyki lub radioterapię. W przypadku nawrotu rokowanie pacjentów jest gorsze (mediana przeżycia pacjentów wynosi od 2 do 9 miesięcy). Wznowa rozwija się z komórek zlokalizowanych blisko pierwotnego marginesu guza migrujących z obszarów obwodowych nowotworu przed zabiegiem chirurgicznym lub pozostających w stanie uspionym na obrzeżach guza. Podczas nawrotu profil genomowy zwykle wykazuje inne zmiany genetyczne niż w przypadku GBM w chwili rozpoznania, co powoduje, że leczenie nawrotowego GBM wciąż pozostaje wyzwaniem [38]. Zatwierdzonym przez FDA (ang. *Food and Drug Administration*) chemioterapeutykiem stosowanym w leczeniu nawrotowego GBM jest bewacyzumab, nieznacznie jednak zwiększający czas przeżycia pacjentów [39].

Z tego względu poszukuje się nowych podejść terapeutycznych w leczeniu GBM. W 1997 roku FDA zatwierdziła zastosowanie płytek Gliadel® w leczeniu nawrotowego, a w roku 2003 również nowo zdiagnozowanego GBM. Płytki te zawierają karmustynę, która zakłóca syntezę i naprawę DNA, a także syntezę RNA czy białek. Płytki Gliadel® wszczepia się do jamy chirurgicznej po usunięciu guza, a następnie karmustyna uwalniana jest przez około 5 dni po operacji [40]. Metaanaliza opublikowana w 2020 roku obejmująca ponad 5800 pacjentów z GBM leczonych karmustyną, wykazała, że pacjentów tych cechował wydłużony czas przeżycia zarówno w przypadku zastosowania samej karmustyny, jak i w połączeniu z TMZ [41].

Obiecującym podejściem wydaje się być zastosowanie terapii adjuwantowej z wykorzystaniem związku chemicznego SNAP w połączeniu z TMZ. Działanie SNAP polega na regulowaniu stężenia tlenku azotu (NO) w organizmie, wpływając na procesy proliferacji i apoptozy komórek nowotworowych. Dowiedziono, że SNAP powodował obniżenie poziomu MGMT, tym samym obniżając chemiooporność na TMZ w komórkach GBM [42].

Kolejnym z podejść jest terapia inhibitorami celującymi w receptory nadmiernie aktywowane w komórkach nowotworowych. Wiadomym jest, że szlaki związane z receptorami kinazy tyrozynowej (RTK, ang. *Receptor Tyrosine Kinase*) mają związek z nowotworami złośliwymi. W GBM obserwuje się mutacje lub amplifikację receptora naskórkowego czynnika wzrostu (EGFR, ang. *Epidermal Growth Factor Receptor*) [43]. Wykazano, że zatwierdzony przez FDA do leczenia niedrobnokomórkowego raka płuc inhibitor EGFR - Afatynib, zwiększa całkowite przeżycie pacjentów z GBM w połączeniu z TMZ [44].

Nową strategią terapeutyczną GBM jest terapia polami TFields utrudniającymi podział komórek nowotworowych poprzez zakłócanie procesu naprawy DNA, zwiększając przy tym działanie TMZ. Terapia ta może też promować działanie ściśle związanego z inwazją GBM szlaku PI3K/AKT/mTOR na autofagię komórkową oraz zwiększać przepuszczalność błony komórkowej dla chemioterapeutyków [45].

Laserowa Termoterapia Śródmiąższowa (LITT, ang. *Laser Interstitial Thermal Therapy*) to technika neurochirurgiczna wykorzystująca energię cieplną. Kierowany przez urządzenie stereotaktyczne światłowód wytwarza ciepło w centrum guza spalając przy tym komórki nowotworowe. Wykazano przedłużone przeżycie nowo zdiagnozowanych pacjentów z GBM po zabiegu LITT. Obiecujące jest również zastosowanie tej terapii w przypadku pacjentów z guzami nieresekcyjnymi [46].

W ostatnich latach FDA zatwierdziła immunoterapię jako standardową metodę leczenia wielu typów nowotworów. To innowacyjne podejście ma na celu zwiększenie skuteczności leczenia poprzez aktywację układu odpornościowego. Główne metody immunoterapii testowane dotychczas w przypadku leczenia GBM to terapia cytokinowa, inhibitory immunologicznych punktów kontrolnych, terapia CAR-T (ang. *Chimeric Antigen Receptor T-cell*), onkolityczne wirusy czy terapie oparte o szczepionki [47]. Powszechnie uznaje się, że GBM wywołuje miejscową i ogólnoustrojową immunosupresję, co czyni go stosunkowo niewrażliwym na immunoterapię [48]. Kolejnym ograniczeniem w immunoterapii GBM jest BBB znacznie utrudniająca dostarczenie leku. Ponadto, GBM jest w stanie indukować zmiany w BBB, tworząc strukturalnie odmienną barierę (barierę nowotworu mózgu), która również przyczynia się do słabej penetracji środków terapeutycznych [49]. Choć w przypadku immunoterapii nie dokonano przełomu, potencjał obecnie prowadzonych badań klinicznych ukazuje obiecującą perspektywę dla pacjentów z GBM [47].

1.2.4. Profil molekularny GBM

Biorąc pod uwagę duże wysiłki badaczy oraz wynikający z nich niewielki sukces w opracowaniu skutecznych metod leczenia GBM, kluczowe znaczenie ma identyfikacja i zrozumienie mechanizmów patofizjologicznych tego nowotworu. W ciągu ostatniej dekady liczba opublikowanych artykułów dotyczących genetyki GBM znacznie wzrosła. W najnowszej klasyfikacji nowotworów OUN z 2021 r., prócz braku mutacji w genie kodującym IDH zdefiniowano trzy parametry genetyczne służące do diagnozowania GBM: mutacja promotora *TERT* (ang. *telomerase reverse transcriptase*), amplifikacja *EGFR* oraz jednoczesne zyskanie dodatkowej kopii chromosomu 7 (lokalizacja *EGFR*) i utrata całego ramienia chromosomu 10 (lokalizacja *PTEN*) [8]. Najczęściej występujące mutacje i zmiany molekularne w GBM wraz z częstością ich występowania zostały przedstawione w Tabeli 3.

Tabela 3. Najczęściej występujące mutacje i zmiany molekularne w GBM.

Nazwa genu	Profil mutacji / zmian molekularnych i ich znaczenie	Częstość występowania w GBM	Źródło
promotor genu <i>TERT</i>	Mutacje promotora genu <i>TERT</i> powodują zwiększenie poziomu odwrotnej telomerazy, skutkując naprawą telomerów i uniknięciem śmierci komórek nowotworowych.	około 80 %	[8, 50]
<i>VEGF</i>	Podwyższony poziom VEGF-A jest głównym mediatorem angiogenezy i progresji nowotworu, a także zapoczątkował opracowanie chemioterapeutyku przeciw VEGF – bewacyzumabu.	64,1%	[51]
<i>TP53</i>	Mutacje w genie <i>TP53</i> są związane z inaktywacją białka p53, skutkując progresją GBM skorelowaną ze zwiększoną inwazją i proliferacją. W niektórych GBM białko p53 może ulec podwyższeniu i przejąć funkcje onkogenne.	34,4 % - 60 %	[52-54]
<i>EGFR</i>	Amplifikacja oraz mutacja (EGFRvIII) w genie <i>EGFR</i> . Gen <i>EGFR</i> koduje kinazę tyrozynową odgrywającą kluczową rolę w proliferacji, różnicowaniu i rozwoju komórek. Mutacja EGFRvIII zwiększa potencjał nowotworowy GBM poprzez aktywację i utrzymanie mitotycznych i antyapoptotycznych szlaków sygnałowych.	33,6 % - 50 %	[8, 55, 56]
<i>MGMT</i>	Metylacja promotora genu <i>MGMT</i> kodującego białko odpowiedzialne za naprawę DNA, prowadzi do wyciszenia genu. Metylacja jest skorelowana z gorszą prognozą przeżycia pacjentów, jednocześnie pacjenci z metylacją wykazują silniejszą odpowiedź na TMZ.	48.5 %	[57]
<i>PTEN</i>	Mutacja w genie kodującym białko PTEN powoduje jego inaktywację, co sprzyja proliferacji komórek i hamuje apoptozę.	20 - 40 %	[55]
<i>MKI-67</i>	Białko Ki-67 to wskaźnik proliferacji komórek wykrywany głównie w obszarach o wysokiej aktywności mitotycznej. Wysoki poziom białka Ki-67 w GBM wiąże się z większą objętością guza,	15 – 40 %	[58, 59]

	zwiększonym ryzykiem nawrotu, a w konsekwencji gorszym rokowaniem.		
<i>NFI</i>	Mutacja w genie <i>NFI</i> powoduje inaktywację białka, zwiększając proliferację, indukcję przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego czy wpływając na komórki odpornościowe i mikrośrodowisko guza.	13 - 14 %	[60, 61]
<i>IDH</i>	Brak mutacji. Obecność mutacji w genie <i>IDH</i> ma związek dłuższą medianą przeżycia pacjentów.	-	[62]

1.2.5. Klasyfikacja GBM

Jedną z głównych przyczyn agresywnego zachowania GBM jest heterogenność obserwowana nie tylko pomiędzy pacjentami (ang. *inter-tumoral heterogeneity*), ale także wewnątrz guza (ang. *intra-tumoral heterogeneity*), charakteryzująca się obecnością zróżnicowanych populacji komórek nowotworowych, komórek macierzystych GBM (GSC, ang. *Glioblastoma Stem Cells*) czy składników mikrośrodowiska nowotworu [63]. W celu lepszego zrozumienia molekularnych podstaw nowotworów, w tym GBM, w ramach projektu TCGA (ang. *The Cancer Genome Atlas*) mającego na celu skatalogowanie, a także odkrycie nowych zmian genetycznych nowotworów, utworzono bazę obejmującą ponad 30 nowotworów u ludzi przeanalizowanych na podstawie wyników sekwencjonowania na dużą skalę [64]. Dzięki wykorzystaniu zgromadzonych danych, w 2010 roku, Verhaak i współautorzy zaproponowali nową klasyfikację GBM obejmującą cztery podtypy: proneuralny, neuralny, klasyczny i mezenchymalny. Analiza ta obejmowała również odpowiedź poszczególnych podtypów na terapię, gdzie najlepszą odpowiedź wykazał podtyp klasyczny a najgorszą proneuralny [65]. W najnowszej aktualizacji Verhaak'a dotyczącej reklasyfikacji podtypów GBM z 2017 roku, podtyp neuralny został usunięty z uwagi na trudności w identyfikacji GBM powstających *de novo* a nawrotowych, ze względu na jego ciągłe zmiany sygnatury genomowej. Co więcej, podtyp neuralny został powiązany z marginesem guza, w którym występuje wysokie prawdopodobieństwo obecności zdrowej tkanki mózgowej [66, 67]. Tabela 4 przedstawia klasyfikację GBM zaproponowaną przez Verhaak'a i współautorów wraz z mutacjami czy zmianami molekularnymi charakteryzującymi dany podtyp, jego agresywność oraz odpowiedź na terapię.

Tabela 4. Charakterystyka podtypów GBM zaproponowanych przez Verhaak'a i współautorów.

Podtyp	Najczęściej występujące mutacje	Agresywność	Przeważający typ komórek	Źródło
Proneuralny	Mutacje w genach <i>TP53</i> i <i>IDH1</i> , regulacja w górę <i>MKI67</i> , amplifikacja <i>PDGFRA</i>	Najniższa	Oligodendrocyty	
Klasyczny	Mutacja w genie <i>PTEN</i> , regulacja w górę <i>TP53</i> , <i>EGFR</i> , <i>NES</i> , <i>VIM</i>	Średnia	Astrocyty	[65, 68, 69]
Mezenchymalny	Mutacja <i>NF1</i> , <i>PTEN</i> , <i>TP53</i> , regulacja w górę <i>MGMT</i> , amplifikacja <i>EGFR</i> , regulacja w dół <i>ATRX</i>	Najwyższa	Komórki glejowe (w tym astrocyty)	

Prócz przyjętej w środowisku naukowym klasyfikacji zaproponowanej przez Verhaak'a, z uwagi na wysoką heterogenność GBM i występujące różnice na poziomie molekularnym w obrębie jednego podtypu, badacze wciąż poszukują najlepszego wzorca w celu dokładniejszej klasyfikacji GBM [55]. Jedną z prób jest stratyfikacja GBM na podstawie wzorca metylacji, który jak wykazano jest ściśle skorelowany z przeżyciem pacjentów [70-72]. Metylacja DNA wcześniej wspomnianego promotora genu *MGMT*, odpowiedzialnego za chemooporność jest obserwowana u prawie połowy pacjentów z GBM [73]. Ponadto, Skiriute i współautorzy odnotowali metylację genów *GATA6* (68,4 % pacjentów), *CASP8* (56,8 % pacjentów), *CD81* (46,1 % pacjentów) i *DR4* (41,3 % pacjentów) [74], natomiast odrębna grupa GBM wykazała hipermetylację wysp CpG (G-CIMP), charakteryzującą się korzystnym rokowaniem wśród pacjentów [75]. W 2019 roku Neftel i współautorzy przy pomocy sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek, zaproponowali cztery stany komórkowe rozwoju GBM, reprezentujące różne typy komórek nerwowych: prekursorowo-neuralny, prekursorowo-oligodendrocytowy, astrocytowy i mezenchymalny, wskazując również na plastyczność danych stanów oraz wpływ mikrośrodowiska na przejście z jednego stanu w inny. Częstotliwość komórek w każdym stanie różniła się w zależności od danej próby GBM i była zależna od amplifikacji *CDK4*, *EGFR* i *PDGFRA* oraz mutacji w genie *NF1* [76]. Obecnie badacze intensywnie poszukują nowych metod klasyfikacji GBM, opartych o niekodujące RNA (ncRNA, ang. *non-coding RNA*), których odmienna sygnatura w połączeniu ze specyficznymi dla danego podtypu cechami, może pomóc w lepszym klasyfikowaniu pacjentów, a w przyszłości opracowaniu bardziej precyzyjnych strategii terapeutycznych [77, 78].

1.2.6. Mikrośrodowisko nowotworu (TME) i komórki macierzyste GBM (GSC)

Mikrośrodowisko nowotworu (TME, ang. *Tumor Microenvironment*) to ekosystem komórek i składników zewnątrzkomórkowych otaczających komórki nowotworowe. TME na ogół składa się z komórek nowotworowych, zrębu, naczyń krwionośnych i składników naczyniowych oraz naciekających komórek zapalnych [79]. W przypadku GBM, obserwuje się również immunosupresyjne TME, które jest kluczowym elementem jego progresji [80]. W tym środowisku komórki odpornościowe, które podejmowałyby działania hamujące nowotwór, przechodzą w stan sprzyjający zapaleniu i ucieczce nowotworu przed układem immunologicznym. Te zmienione komórki odpornościowe obejmują mikroglej, reaktywne astrocyty, makrofagi związane z nowotworem (TAM, ang. *Tumor-Associated Macrophages*), czy komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego (MDSC, ang. *myeloid-derived suppressor cells*) [81-84]. TAM pochodzą z mikrogleju znajdującego się w mózgu i są uważane za dominującą naciekającą populację immunologiczną, stanowiącą około 30 – 40 % populacji komórek w GBM [85]. TAM poprzez produkcję cytokin i czynników wzrostu, mogą promować wzrost nowotworu i angiogenezę, a także mają związek z opornością pacjentów na leczenie [86, 87]. MDSC również odgrywają ważną rolę w immunosupresji nowotworu [88]. Dowiedziono, że MDSC mogą hamować przeciwnowotworową odpowiedź komórek NK (ang. *Natural Killer Cells*), a także limfocytów T poprzez wytwarzanie reaktywnych form tlenu (ROS, ang. *Reactive Oxygen Species*) [89, 90]. Dodatkowo, komórki nowotworowe GBM uwalniają ligandy, takie jak PD-L1 (ang. *Programmed Death-Ligand 1*), które po związaniu się z receptorem PD1 (ang. *Programmed Death Receptor 1*) hamują odpowiedź immunologiczną [91].

Komórki macierzyste GBM (GSC, ang. *Glioblastoma Stem Cells*) reprezentują subpopulację samoodnawiających się komórek zaangażowanych w utrzymanie guza. Wykazano, że komórki te wykazują się wysoką plastycznością, zdolnością do proliferacji i tworzenia innych typów komórek budujących guz [92]. GSC odgrywają kluczową rolę nie tylko w przeżyciu komórek, ale także w różnicowaniu i inwazji [93-95]. Wykazano, że GSC są odporne na chemio- i radioterapię, umożliwiając komórkom GBM przetrwanie, prowadząc do niemal nieuniknionej wznowy [96-98]. Jednym z markerów powierzchniowych GSC jest CD133 - białko transbłonowe kodowane przez gen *promininę 1* [99]. Choć GSC znajdują się głównie w niedotlenionych i okołonaczyniowych obszarach masy guza, ich populację znaleziono również w TME [100, 101]. Istnieje powiązanie między GSC a komórkami śródbłonna tworzącymi naczynia krwionośne. Wykazano, że oddziaływanie między tymi

komórkami jest dwukierunkowe. Z jednej strony, komórki śródbłonka wytwarzają liczne czynniki wzrostu, które napędzają samoodnowę i przeżycie GSC [102, 103], dodatkowo region okołonaczyniowy wzbogacony jest w białka macierzy zewnątrzkomórkowej (np. lamininę czy integrinę $\alpha 6$), które promują proliferację i migrację GSC [104]. Z drugiej strony GSC mogą uwalniać VEGF w celu promowania migracji komórek śródbłonka i tworzenia nowych naczyń [105]. Ważna dla utrzymania populacji GSC jest również nisza hipoksyjna, w której obserwujemy nadekspresję czynników indukowanych hipoksją 1α (HIF 1α , ang. *Hypoxia-Induced Factor 1 α*) oraz HIF 2α (ang. *Hypoxia-Induced Factor 2 α*) [106, 107]. Kontrola TME wraz z wyeliminowaniem GSC, mogłaby być uzupełnieniem standardowej terapii GBM, przez jednoczesne hamowanie wznowy guza, a także zapobieganie immunosupresji, co pozwoliłoby na skuteczną odpowiedź immunologiczną.

1.2.7. Środowisko hipoksyjne w GBM

Hipoksja to stan, w którym komórka zostaje pozbawiona odpowiedniego natlenienia, spowodowany zapotrzebowaniem na tlen przekraczającym jego podaż. Niedotlenienie w nowotworach związane jest głównie ze zwiększoną proliferacją komórek, powiązaną z nieregularną neowaskularyzacją guza, prowadząc do słabej dyfuzji tlenu [108-110]. Mimo, że GBM jest jednym z nowotworów o najwyższym unaczynieniu u ludzi, jego mikrokrążenie jest bardzo nieefektywne, co skutkuje powstawaniem wysoce niedotlenionych obszarów wewnątrz guza i towarzyszącej im nekrozy [111]. Dodatkowo, niedostateczna podaż składników odżywczych spowodowana niedotlenieniem sprzyja zmianom genetycznym. Wykazano, że niedotlenienie komórek GBM jest silnie powiązane z inwazją nowotworu oraz opornością na leczenie [112-114]. Co więcej, niedotlenione regiony sprzyjają utrzymaniu i ekspansji GSC [115]. Odpowiedzią komórek nowotworowych na niesprzyjające warunki środowiska, jakim jest hipoksja, jest autofagia, jednak jej wpływ na komórki GBM pozostaje niejednoznaczny. Autofagia może chronić komórki nowotworowe przed chemio- i radioterapią, z drugiej strony zaś może hamować wzrost komórek i wywoływać starzenie się [116]. Ostatnie badania kliniczne z użyciem chlorochiny będącej inhibitorem autofagii przyniosły zadowalające efekty w leczeniu GBM [117]. Modulacja autofagii wydaje się być obiecującą strategią w leczeniu GBM, dlatego tak ważne jest dokładniejsze poznanie nie tylko samej autofagii, ale także towarzyszącego temu procesowi środowiska hipoksyjnego.

1.2.8. Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV) w GBM

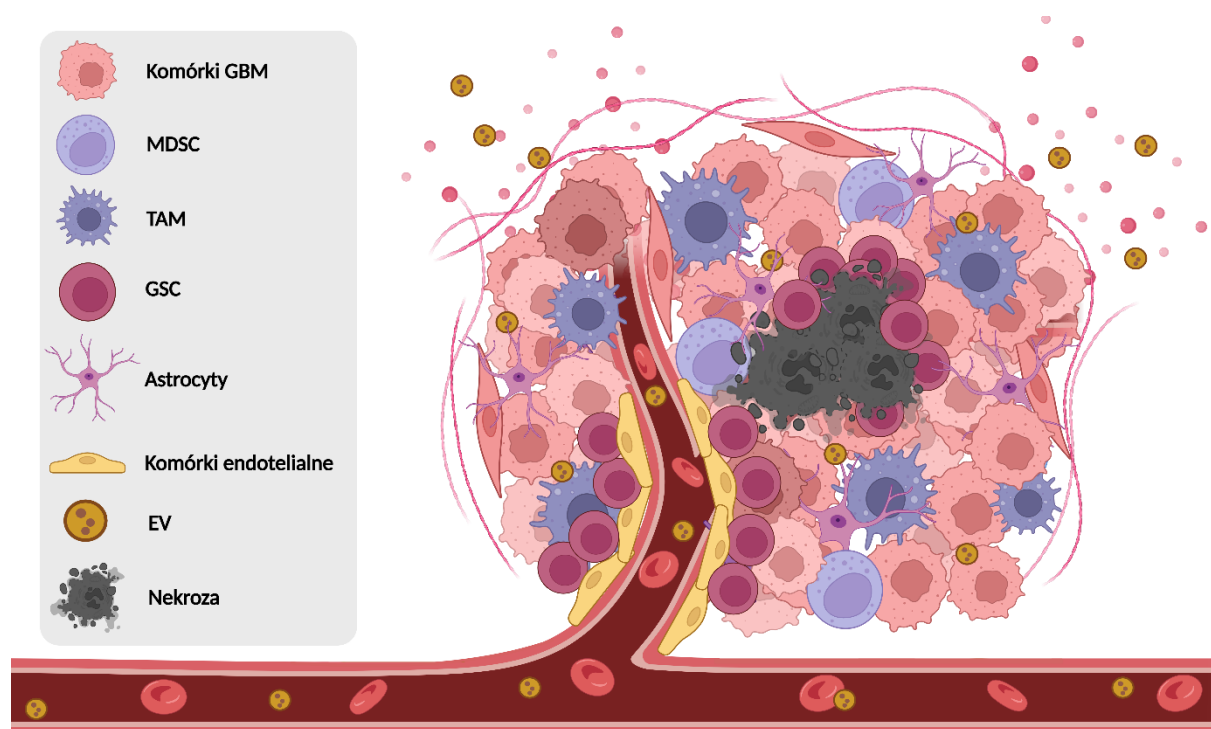
Pęcherzyki zewnątrzkomórkowe (EV, ang. *Extracellular Vesicles*) mogące zawierać zarówno białka, lipidy, DNA, mRNA (ang. *messenger RNA*) czy ncRNA, oddzielają się od powierzchni komórki i biorą udział w przenoszeniu cząsteczek związanych z błoną do sąsiednich komórek lub płynów pozakomórkowych. Możemy wyróżnić dwa główne typy EV: egzosomy (ang. *exosomes*) i mikropęcherzyki (ang. *microvesicles*). Egzosomy są mniejsze (średnica od 30 do 150 nm) i pochodzą z błony endosomalnej, natomiast wielkość mikropęcherzyków waha się od 50 do 1300 nm i są uwalniane bezpośrednio w wyniku pęczkowania błony komórkowej. Prócz nich występują również cząstki błonowe (ang. *membrane particles*) i pęcherzyki apoptotyczne (ang. *apoptotic vesicles*). EV można wykryć za pomocą transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM, ang. *Transmission Electron Microscopy*), analizy śledzenia nanocząstek (NTA, ang. *Nanoparticle Tracking Analysis*), czy obecności szeregu białek związanych z błoną, takich jak CD63, CD81, CD9, CD37, CD53, CD82, ICAM-1 i integryny, zidentyfikowanych za pomocą cytometrii przepływowej lub techniki Western Blot [118].

EV odgrywają kluczową rolę w komunikacji międzykomórkowej w obrębie nowotworu, modulując interakcje komórkowe a także wpływając na jego TME. Dowiedziono, że EV mogą pośredniczyć w indukcji przejścia nabłonkowo-mezenchymalnego (EMT, ang. *Epithelial–Mesenchymal Transition*) i nadawaniu komórkom zdolności do migracji [119, 120]. Ponadto, przyczyniają się do rozwoju i progresji nowotworu, wzmożonej angiogenezy i oporności na leczenie [121-123]. EV mogą również ułatwiać tworzenie immunosupresyjnego TME, pomagając komórkom nowotworowym w uniknięciu odpowiedzi układu odpornościowego poprzez zmniejszenie immunogenności, indukcję komórek supresorowych, modulowanie prezentacji antygenów i wydzielanie czynników immunosupresyjnych [124]. Co więcej, EV mogą być również wydzielane przez GSC i ułatwiać komunikację tej populacji komórkowej [125]. Wykazano, że komórki GBM posiadające zmutowaną wersję białka EGFRvIII, dzięki przekazywaniu EV do sąsiednich komórek nieposiadających tej mutacji, wzmagają ich proliferację [126]. Setti i współautorzy wykazali, że białko CLIC1, obecne w EV uwalnianych przez GSC, promuje wzrost i rozwój komórek [127]. EV przenosząc niekodujące RNA ncRNA, mogą przyczyniać się do zwiększonego tempa rozwoju komórek, hamowania apoptozy czy wywołać oporność na chemioterapię w dotychczas wrażliwych komórkach [128-130].

Dzięki zdolności do przekraczania BBB, EV odgrywają istotną rolę nie tylko w komunikacji międzykomórkowej, ale także w progresji i diagnostyce GBM. Płyny ustrojowe,

takie jak krew, płyn mózgowo-rdzeniowy, ślina czy mocz stanowią cenne źródło informacji, pozwalając na wykrycie cząsteczek takich jak białka, DNA czy RNA [131, 132]. W przeciwieństwie do wolnokrążących cząsteczek w płynach ustrojowych, te obecne w EV wykazują się większą stabilnością, co czyni je obiecującymi biomarkerami GBM [118, 133]. Wykazano, że stężenie EV było zwiększone u pacjentów z GBM w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną i pacjentami z innymi chorobami OUN. Dodatkowo, stwierdzono, że ich wzrost korelował ze wznową GBM, co sugeruje, że EV mogą być przydatne także w przewidywaniu nawrotu tego nowotworu [134]. Badania dowodzą, że EV mogą okazać się obiecujące nie tylko w diagnostyce czy ocenie progresji GBM, ale także terapii odgrywając rolę w dostarczaniu leków ze względu na ich niezdolność do wywoływania odpowiedzi immunologicznej [133].

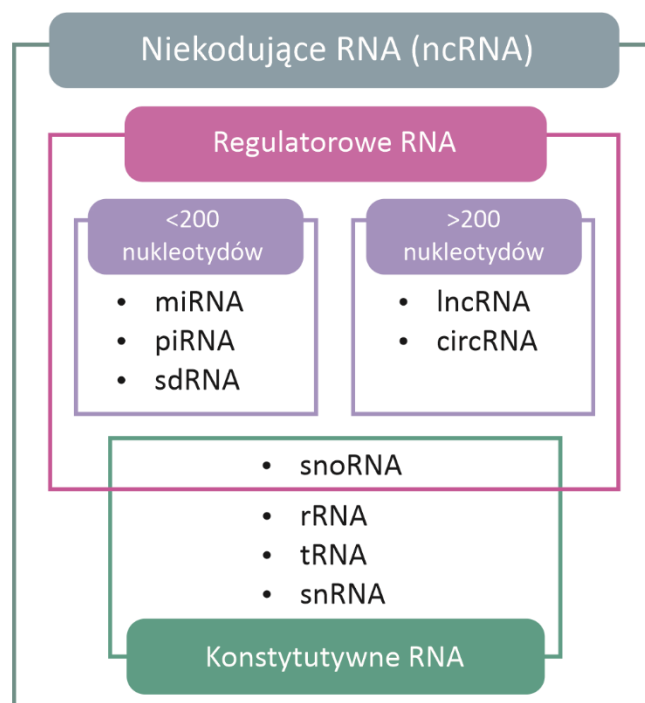
TME w GBM wraz z obecną populacją GSC, EV oraz obszarami hipoksyjnymi z widoczną nekrozą zostało przedstawione na Rycinie 1.



Rycina 1. Mikrośrodowisko (TME) w GBM. MDSC – komórki supresorowe pochodzenia mieloidalnego, TAM – makrofagi związane z nowotworem, GSC – komórki macierzyste GBM, EV – pęcherzyki zewnątrzkomórkowe.

1.3. Niekodujące RNA (ncRNA)

Szacuje się, że transkrypcji ulega około 70 – 80 % ludzkiego genomu, z czego tylko około 2 % koduje białka, pozostałe cząsteczki natomiast należą do klasy ncRNA [135]. Klasyfikacja ncRNA obejmuje dwie grupy: konstytutywne oraz regulatorowe. Konstytutywne ncRNA są niezbędne do utrzymania podstawowych funkcji komórkowych i obejmują cząsteczki zaangażowane w procesy translacji - rybosomalny RNA (rRNA, ang. *ribosomal RNA*) i transportujący RNA (tRNA, ang. *transfer RNA*), splicingu – mały jądrowy RNA (snRNA, ang. *small nuclear RNA*) czy modyfikacji RNA – mały jąderkowy RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*) [136]. Te ostatnie (snoRNA) mogą pełnić również funkcje regulatorowe. Regulatorowe RNA można podzielić w zależności od ich długości, na krótkie ncRNA dla transkryptów krótszych niż 200 nukleotydów (tu wyróżniamy mikroRNA (miRNA, ang. *microRNA*), piRNA (ang. *piwi-interacting RNA*) i sdRNA (ang. *sno-derived RNA*) i długie ncRNA, które mają długość powyżej 200 nukleotydów, do których należą długie niekodujące RNA (lncRNA, ang. *long non-coding RNA*) oraz koliste RNA (circRNA, ang. *circular RNA*) [137]. Podział ncRNA został przedstawiony na Rycinie 2.



Rycina 2. Podział niekodujących RNA (ncRNA). Opracowano na podstawie [137].

Na przełomie lat stało się jasne, że ncRNA odgrywają znaczącą rolę w rozwoju i progresji nowotworów, w tym GBM. Dowiedziono, że lncRNA XIST wykazuje wysoką ekspresję w GBM i wzmacnia angiogenezę [138], a lncRNA H19 czy remodelujący chromatynę HOTAIR promują proliferację i jednocześnie hamują proces apoptozy [139, 140]. Z kolei circRNA MMP9 o wysokiej ekspresji w GBM nie tylko promuje proliferację, ale także migrację i inwazję tego nowotworu [141]. Inni badacze odnotowali zależność między zwiększonym poziomem ekspresji circASAP1 w komórkach GBM a opornością na TMZ [142].

Wśród regulatorowych krótkich RNA, najlepiej przebadaną grupą są miRNA. Cząsteczki te zostały opisane zarówno jako supresory, jak i onkogeny w GBM. Najbardziej znanym onkogenem w GBM jest miR-21, który jest zaangażowany w regulację apoptozy, proliferację i oporność na chemioterapię [143-146]. Innymi szeroko badanymi onkogenami w GBM są miR-93 i miR-10b, regulujące takie procesy, jak proliferacja, migracja, inwazja czy chemiooporność, a ekspresja miR-10b była dodatkowo pozytywnie skorelowana z stopniem zaawansowania GBM [147-152]. Z kolei wśród miRNA pełniących funkcje supresorowe w GBM, najszerzej opisanymi są miR-7, miR-34a czy miR-128 [153-156].

1.3.1. NcRNA jako potencjalne biomarkery GBM

1.3.1.1. Wolnokrążące ncRNA w płynach ustrojowych

Poszukiwanie biomarkerów GBM staje się nieodzownym elementem badań naukowych, ukierunkowanych na wypracowanie skutecznych strategii zarówno diagnostycznych, jak i terapeutycznych. Biomarkery te mogą występować jako wolnokrążące cząsteczki, a także być obecne w krążących komórkach nowotworowych (CTC, ang. *Circulating Tumor Cells*) czy wspomnianych wcześniej EV [118].

Obecność BBB w mózgu może stanowić przeszkodę w uwalnianiu biomarkerów do krążenia ogólnoustrojowego, w tym do krwi, dlatego płyn mózgowo-rdzeniowy wydaje się być lepszym ich źródłem, ze względu zarówno na kontakt z tkanką mózgową, a także bliskość samego guza [131]. W płynie mózgowo-rdzeniowym zaobserwowano wysoki poziom wolnokrążących miR-10b i miR-21 u pacjentów ze zdiagnozowanym GBM [157, 158]. Z kolei Akers i współautorzy odnotowali dziewięć miRNA (miR-21, 218-5p, 193b-3p, 331-3p, 374a-5p, 548c-3p, 520f-3p, 27b-3p i 30b-3p), potencjalnie służących jako nowe biomarkery GBM [159], a inni badacze wytypowali pięć miRNA obecnych w płynie mózgowo-rdzeniowym (miR-30e, miR-140, let-7b, miR-10a i miR-21-3p), dzięki którym możliwe było rozróżnienie GBM od glezaków o niskim stopniu złośliwości, czy oponiaków i przerzutów do mózgu [160].

Ze względu na łatwość pobierania i bezpieczeństwo pacjentów, a także koszty diagnozy i szybkość jej wykonania, badacze coraz częściej skupiają się na poszukiwaniu biomarkerów obecnych we krwi pacjentów. Metaanaliza przeprowadzona w 2019 roku obejmująca ponad 2000 pacjentów z GBM wykazała, że wolnokrążące miRNA mogą być skuteczne w diagnozowaniu GBM, a najlepszymi biomarkerami okazały się być cząsteczki miR-21, miR-125 i miR-222 [161]. Wykazano również, że poziom wolnokrążących we krwi miR-222 i miR-221 był znacznie wyższy u pacjentów z GBM w porównaniu ze zdrową grupą kontrolną i jednocześnie skorelowany z gorszym rokowaniem wśród pacjentów [162]. Inni badacze zaobserwowali związek pomiędzy poziomami w plazmie krwi pacjentów z GBM cząsteczek miR-20a-5p, miR-106a-5p i miR-181b-5p a stopniem złośliwości [163] oraz cząsteczek miR-19a-3p, miR-106a-5p i miR-181b-5p a przeżyciem pacjentów [164]. Shen i współautorzy odnotowali natomiast wysoki poziom lncRNA HOTAIR oraz niski poziom lncRNA GAS5 w plazmie pacjentów z GBM skorelowane z gorszą prognozą przeżycia pacjentów [165]. Jednocześnie, HOTAIR został uznany przez innych badaczy za obiecujący marker w diagnostyce GBM [166].

1.3.1.2. NcRNA obecne w EV w płynach ustrojowych

Z uwagi na większą stabilność cząsteczek zawartych w EV aniżeli wolnokrążących, cząsteczki w nich zawarte wydają się być obiecującymi biomarkerami [118, 133]. MiRNA o wysokim poziomie w EV pochodzących z plazmy pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, pozwoliły na odróżnienie pacjentów z GBM od zdrowych osób z grupy kontrolnej. Takiej obserwacji dokonali Santangelo i współautorzy, którzy odnotowali wysoki poziom cząsteczek miR-21, miR-222 i miR-124-3p, a cząsteczka miR-21 pozwoliła na odróżnienie zdrowych osób z grupy kontrolnej od pacjentów z GBM [167]. Podobnej obserwacji dokonali Manterola i współautorzy, którzy przeanalizowali obecność miRNA w EV z plazmy 75 pacjentów z GBM i potencjalnymi biomarkerami okazały się być cząsteczki miR-320, miR-574-3p, jak również snRNA RNU6-1 [168], a cząsteczki miR-182-5p, miR-328-3p, miR-339-5p, miR-340-5p, miR-485-3p, miR-486-5p i miR-543 odróżniły pacjentów z GBM od zdrowych osób z grupy kontrolnej z dokładnością 91,7 % [169]. Inni badacze dowiedli, że miR-301a może być potencjalnym biomarkerem zarówno diagnostycznym jak i prognostycznym GBM, gdyż jego poziom był wyższy w glejakach o wysokim stopniu złośliwości, po chirurgicznej resekcji obniżał się, po czym znów wzrastał podczas nawrotu choroby [170]. W badaniu przeprowadzonym przez Simionescu i współautorów zaobserwowano różne wzorce ekspresji miRNA w mikropęcherzykach pochodzących od pacjentów z GBM, a miR-625-5p został przez

nich uznany jako biomarker do monitorowania regresji lub nawrotu tego nowotworu [171]. W egzosomach zaobserwowano również circSMARCA5 i circHIRK2 należące do circRNA [172] i snoRNA SNORD116-21 [173]. Yuan i współautorzy dowiedli również, że poziom egzosomalnego lncRNA HOTAIR był znacząco wyższy w komórkach GBM opornego na TMZ [35].

1.3.2. Charakterystyka małych jąderkowych RNA (snoRNA)

Małe jąderkowe RNA (snoRNA, ang. *small nucleolar RNA*) to rodzina konstytutywnych ncRNA o długości 60 – 300 nukleotydów. Są one zlokalizowane głównie w jąderkach i ciałkach Cajala – małych, pozbawionych błony ziarnistościach obserwowanych w jądrach komórek proliferujących, jak komórki nowotworowe [174]. Sekwencjonowanie RNA frakcji zarówno jądrowej jak i cytoplazmatycznej, potwierdziło obecność snoRNA głównie w jądrze [175]. SnoRNA obecne w jąderkach – miejscu syntezy rRNA, nazywane są kanonicznymi, natomiast te występujące w ciałkach Cajala, gdzie zachodzi ostatni etap powstawania spliceosomalnego RNA nazywane są scaRNA (ang. *small Cajal body-specific RNA*).

Na podstawie ich charakterystycznych elementów sekwencji wyróżniamy dwie główne klasy snoRNA: klasa C/D i klasa H/ACA. SnoRNA należące do klasy C/D (SNORD) zawierają w swojej sekwencji motyw C (RUGAUGA, gdzie „R” oznacza purynę) i motyw D (CUGA) oraz mniej zachowawcze motywy C’ i D’. Natomiast te należące do klasy H/ACA (SNORA) zawierają w swojej strukturze dwie „spinki do włosów” oddzielone motywem H (ANANNA, gdzie „N” oznacza dowolny nukleotyd) i zakończone motywem ACA (ACA) [176, 177]. Wśród snoRNA możemy wyróżnić również tak zwane „sieroce snoRNA” (ang. *orphan snoRNA*), które nie posiadają specyficznych motywów sekwencji i pełnią nieznaną funkcję [178, 179]. Rycina 3 przedstawia klasy snoRNA wraz z charakterystycznymi dla nich motywami sekwencji.

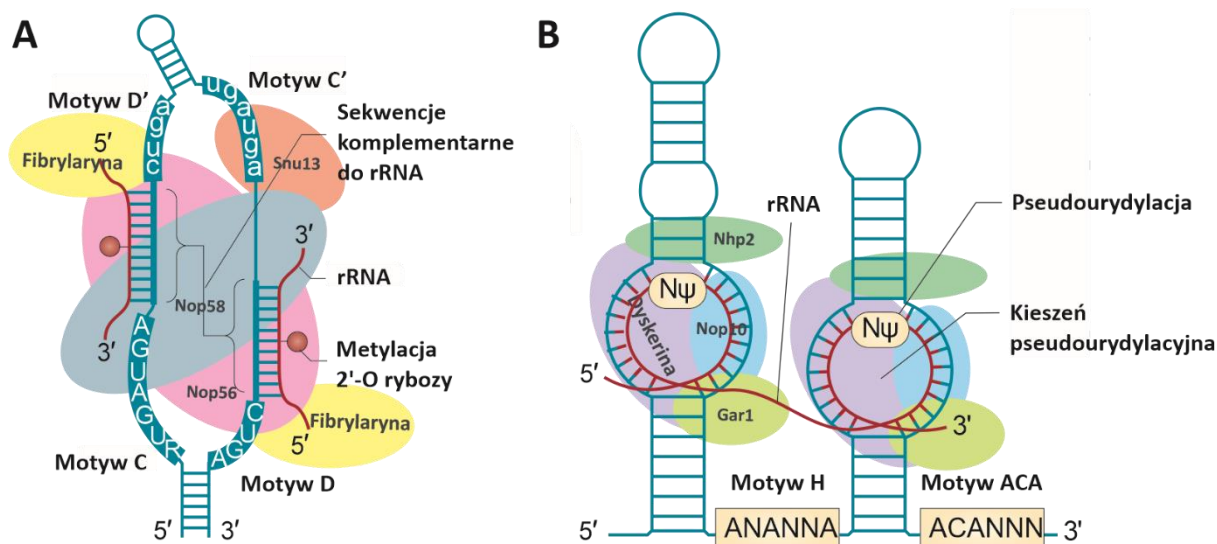
1.3.2.1. Biogeneza snoRNA

SnoRNA są kodowane głównie przez regiony intronowe zarówno genów kodujących białka, jak i tych niekodujących białek [180]. Dowiedziono, że produkcja snoRNA jest powiązana z produkcją rybosomów w związku z pełnioną przez nie funkcją [181]. Większość snoRNA zlokalizowana jest w konserwatywnym obszarze intronów genów metabolizmu podstawowego, kodujących białka niezbędne do biogenezy czy funkcjonowania rybosomów i jest transkrybowana przez polimerazę II [182]. Podczas splicingu, introny są wycinane, tworząc lasso, które następnie może ulec degradacji. SnoRNA unikają degradacji enzymatycznej

poprzez tworzenie kompleksów z białkami, tak zwanych małych jąderkowych rybonukleoprotein (snoRNP, ang. *small nucleolar ribonucleoprotein*) [183]. W celu utworzenia kompleksu, białka są transportowane z cytoplazmy. Uważa się, że jedno lub więcej białek wiąże się z cząsteczką pre-snoRNA, po czym następuje jej obróbka nukleolityczna przez enzymy. Tak powstałe snoRNP, przemieszczają się następnie do jąderka lub ciałek Cajala. Wyniki sugerują, że snoRNP mogą krążyć pomiędzy nimi, w miarę wzrostu i spadku zapotrzebowania na funkcje jąderkowe [181]. SnoRNA należące do klasy C/D w celu pełnienia przez nie funkcji łączą się z fibrylaryną, natomiast te należące do klasy H/ACA z dyskeriną, a następnie z zestawem białek specyficznych dla danej klasy, które są wymagane do aktywności enzymatycznej, stabilności i lokalizacji snoRNP. Białkami specyficznymi dla klasy C/D są Nop56, Nop58, Snu13, natomiast w klasie H/ACA są to Gar1, Nhp2 i Nop10 [184]. Rycina 3 ukazuje białka wiążące się z danymi klasami snoRNA.

1.3.2.2. Funkcje snoRNP

SnoRNP pełnią swoją funkcję zarówno poprzez mechanizmy kanoniczne, jak i niekanoniczne. Mechanizm kanoniczny snoRNP jest zaangażowany głównie w modyfikacje potranskrypcyjne rRNA, snRNA i tRNA, odgrywając kluczową rolę w biogenezie rybosomów, splicingu czy translacji [185]. W zależności od klasy do jakiej należą, snoRNP biorą udział w dwóch różnych typach modyfikacji potranskrypcyjnych: metylacji 2'-O rybozy przez klasę C/D i pseudourydylacji polegającej na konwersji urydyny do pseudourydyny przez klasę H/ACA [186]. W przypadku metylacji 2'-O rybozy, sekwencja elementów antysensownych obecnych w motywach C' i D' snoRNA jest komplementarna do sekwencji docelowych rRNA [187]. Z kolei pseudourydylacja zachodzi w tak zwanych kieszeniach pseudourydylacyjnych, obecnych w strukturze snoRNA z klasy H/ACA [177]. Klasy snoRNA wraz z charakterystycznymi dla nich motywami sekwencji, białkami wiążącymi i pełnionymi funkcjami zostały przedstawione na Rycinie 3.



Rycina 3. Klasy snoRNA wraz z charakterystycznymi dla nich motywami sekwencji, wiążącymi białkami i pełnionymi funkcjami. A. Klasa C/D snoRNA wraz z charakterystycznymi dla niej motywami C, D, C' oraz D', a także specyficznymi dla tej klasy białkami wiążącymi: fibrylaryną razem z Nop56, Nop58 i Snu13. **B.** Klasa H/ACA snoRNA zawierająca w swojej strukturze dwie „spinki do włosów” oddzielone motywem H i zakończone motywem ACA, a także specyficzne dla tej klasy białka wiążące: dyskerina wraz z Nop10, Nhp2 i Gar1. Opracowano na podstawie [174, 188].

Oprócz funkcji kanonicznych, snoRNP mogą również funkcjonować poprzez mechanizmy niekanoniczne. Dowiedziono, że mogą brać udział w modyfikacjach takich jak metylacja tRNA [189] czy acetylacja rRNA [190]. Inni badacze zaobserwowali kompleksy snoRNA wraz z białkami przetwarzającymi koniec 3' mRNA, co może wskazywać na ich udział w liczebności mRNA, poprzez hamowanie bądź promowanie jego przetwarzania czy stabilizację kompleksów RNA – białko, powstałych podczas poliadenylacji [191]. Ono i współautorzy wykazali, że snoRNA należące do klasy C/D HBII-180c nie tylko bierze udział w metylacji 2'-O rybozy, ale także posiada region M-box, dzięki któremu może działać jako miRNA w procesie interferencji [192]. Inni badacze zidentyfikowali białka rdzeniowe snoRNP – fibrylarynę i NOP56 w kompleksach z AGO2 i AGO1, co potwierdza te doniesienia [193]. Wykazano również, że snoRNA HBII-52 może brać udział w regulacji alternatywnego splicingu receptora serotoniny 2C, a SNORD86 kontroluje poziom jednego z głównych białek wiążących snoRNA – NOP56 również poprzez regulację alternatywnego splicingu [194, 195]. Inni badacze zaobserwowali natomiast, że SNORA73 może być związane z chromatyną wpływając na stabilność genomu [196].

1.3.2.3. SnoRNA w nowotworach

Liczne badania wskazują na udział snoRNA w proliferacji, migracji i inwazji komórek nowotworowych, a także ich wpływ na populację GSC czy przeżycie pacjentów, pełniąc w większości przypadków rolę onkogenów w różnych typach nowotworów [188, 197]. Doniesienia dotyczące GBM są jednak nieliczne i dotyczą SNORD47 i SNORD76 znanych jako supresory w tym nowotworze [198, 199]. Tabela 5 zawiera wybrane snoRNA wraz z ich pełnioną rolą w wybranych nowotworach.

Tabela 5. Wybrane snoRNA wraz z pełnioną przez nie funkcją w wybranych nowotworach, w tym GBM.

Nazwa snoRNA	Działanie	Funkcje	Źródło
GBM			
SNORD47	Supresor	Hamuje proliferację poprzez szlak Wnt, wydłuża czas przeżycia u ortotopowych myszy	[198]
SNORD76	Supresor	Hamuje proliferację i rozwój komórek poprzez wpływ na zwiększenie ekspresji pRb	[199]
Rak płuc			
SNORA7A, SNORA7B, SNORA65	Onkogeny	Wpływają na zwiększoną proliferację, inwazję i migrację komórek	[200]
SNORD78	Onkogen	Promuje inwazję poprzez EMT, jego wysoki poziom został odnotowany w GSC	[201]
SNORA71A	Onkogen	Promuje proliferację, migrację i inwazję komórek poprzez szlak sygnałowy MAPK	[202]
Rak jelita grubego			
SNORD1C	Onkogen	Promuje rozwój nowotworu, pomaga w utrzymaniu populacji komórek macierzystych, związany ze zmniejszonym przeżyciem u pacjentów	[203]

SNORD12C/78	Onkogen	Promuje rozwój nowotworu poprzez metylację 2'O-rybozy za pośrednictwem NOP58	[204]
SNORA21	Onkogen	Wpływa na odległe przerzuty i gorszą prognozę przeżycia pacjentów	[205]
Rak żołądka			
SNORD105B	Onkogen	Promuje proliferację, migrację i inwazję komórek poprzez szlak sygnałowy ALDOA / C-myc	[206]
SNORA21	Onkogen	Wpływa na odległe przerzuty, wpływa na gorszą prognozę przeżycia pacjentów	[207]
Rak piersi			
SNORA50	Supresor	Hamuje tworzenie kolonii poprzez metylację 28S rRNA	[208]
SNORA71B	Onkogen	Promuje proliferację, migrację i inwazję komórek	[209]
SNORA7B	Onkogen	Promuje proliferację, migrację i inwazję komórek, wpływa na gorszą prognozę przeżycia pacjentów	[210]
Rak wątrobowokomórkowy			
SNORD52	Onkogen	Promuje proliferację poprzez stabilizację CDK1, wpływa na gorszą prognozę przeżycia pacjentów	[211]
SNORA42	Onkogen	Promuje rozwój nowotworu poprzez szlak sygnałowy p53	[212]
SNORA23	Supresor	Hamuje proliferację, migrację i inwazję komórek poprzez metylację 2'O-rybozy 28 S rRNA	[213]
Rak jajnika			
SNORA72 SNORD89	Onkogeny	Aktywują transformację komórek raka jajnika w komórki macierzyste	[214, 215]
Białaczka			
SNORD42A	Onkogen	Promuje proliferację i tworzenie kolonii	[216]

1.3.3. Krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (sdRNA)

W ostatnich latach wykazano, że krótkie fragmenty RNA pochodzące ze snoRNA są specyficznymi ciętymi i funkcjonalnymi. Krótkie RNA pochodzące ze snoRNA (sdRNA, ang. *sno-derived RNA*) należących do klasy H/ACA mogą mieć długość od 20 - 24 nukleotydów, natomiast te pochodzące z klasy C/D wykazują rozkład długości od 17 - 19 lub powyżej 27 nukleotydów [217, 218]. Badacze wykazali, że loci genomowe niektórych prekursorów miRNA pokrywają się z loci snoRNA, a analiza ich sekwencji ujawniła szereg znanych miRNA pochodzących z obydwu klas snoRNA [218, 219]. Sekwencjonowanie frakcji jądrowej i cytoplazmatycznej wykazało, że większość sdRNA pochodzących z klasy C/D snoRNA lokuje się w jądrze [175]. Z kolei niektóre sdRNA znane są ze swojej funkcji w procesie interferencji RNA, co wskazuje na ich cytoplazmatyczną lokalizację [219, 220].

1.3.3.1. Potencjalne mechanizmy powstawania sdRNA

Uważa się, że przetwarzanie prekursorów snoRNA nie jest przypadkowe, a selektywność miejsc cięcia może być wyznaczana przez same snoRNA czy białka biorące udział w biogenezie sdRNA lub zależna od struktury drugorzędowej snoRNA [183]. Dokładny mechanizm powstawania sdRNA nie jest jednak znany. Z uwagi na sugerowane pochodzenie niektórych miRNA ze snoRNA, a także podobny rozkład długości miRNA i sdRNA, uważa się, że mechanizmy biorące udział w powstawaniu tych cząsteczek mogą być zbliżone.

1.3.3.1.1. Mechanizm powstawania zależny od DICER

Większość miRNA u ludzi jest kodowana w regionach międzygenowych lub w obrębie intronów, ale także w eksonach genów kodujących białka i transkrybowana w jądrze przez polimerazę II. W wyniku transkrypcji powstaje tak zwany pri-miRNA, który jest następnie przetwarzany w jądrze przez domenę wiążącą RNA DGCR8 oraz białko DROSHA o aktywności RNazy III, tworząc pre-miRNA, który najczęściej przyjmuje strukturę „spinki do włosów”. Kolejno, pre-miRNA jest transportowane do cytoplazmy, gdzie zostaje przecięte przez białko DICER o właściwościach RNazy III, w wyniku czego powstają duplekty miRNA-miRNA*. Jedna z nici, tak zwana nić wiodąca, łączy się z białkiem AGO2, tworząc kompleks miRISC, a druga nić, zwana nicią pasażerską ulega degradacji [221]. Niedawno opublikowana praca wskazuje na mechanizm przetwarzania snoRNA niezależny od enzymu DICER. W tej pracy, Godang i współautorzy wykazali, że dla zdecydowanej większości poziom sdRNA uległ zmniejszeniu w komórkach pozbawionych genu *DICER*, z kolei dla miRNA zaobserwowano odwrotną zależność [222]. Co więcej, inni badacze zaobserwowali, że cięcie snoRNA

SCARNA15 na sdRNA jest zależne od białka Dicer, ale niezależne od kompleksu DROSHA/DGCR8 [223]. Analiza wyników sekwencjonowania wykazała, że poziom większości sdRNA pochodzących z klasy H/ACA był niższy w komórkach z delecją genu *DICER* i genu *DGCR8*. Z drugiej strony zaś, białko DGCR8 może również pełnić rolę inhibitora biogenezy tych cząsteczek, gdyż poziom niektórych z nich był wyższy po delecji genu tego białka [217]. Przeprowadzona przez innych badaczy immunoprecypitacja z „cross-linking” potwierdziła wiązanie DGCR8 ze snoRNA, a delecja genu tego białka miała wpływ na obniżenie poziomu sdRNA niezależnie od DROSHA, co wskazuje na wiązanie DGCR8 z inną nukleazą w procesie biogenezy sdRNA [224]. Z kolei Logan i współautorzy dowiedli, że SCARNA9, SCARNA2 i SCARNA17 są przetwarzane przez kompleks DROSHA/DGCR8, generując krótkie sdRNA [225, 226].

1.3.3.1.2. Mechanizm powstawania zależny od AGO2

Jednym z najbardziej znanych miRNA powstających niezależnie od enzymu DICER jest miR-451 [227], który powstaje z udziałem białka AGO2. Białko to należy do rodziny Argonaute (Ago) i dzięki obecności domen PAZ i MID wiąże RNA, a dzięki domenie PIWI z funkcjonalną triadą DDH, jako jedyne z rodziny, może pełnić funkcję nukleolityczną [228]. AGO2 jest zlokalizowane głównie w cytoplazmie, najnowsze doniesienia jednak mówią o jego obecności w jądrze w niektórych komórkach ludzkich [229, 230] oraz mysich [231, 232]. W szlaku powstawania miRNA zależnym od białka AGO2, po jądrowej obróbce przez kompleks DROSHA/DGCR8, przetransportowane do cytoplazmy pre-miRNA łączy się bezpośrednio z białkiem AGO2, które umożliwia powstanie dojrzałego miRNA [227, 233]. W kompleksach z AGO2 badacze zidentyfikowali fibrylarynę – jedno z białek należących do kompleksu snoRNP, co może sugerować wiązanie AGO2 ze snoRNA w celu ich przetworzenia [193].

1.3.3.1.3. Inne mechanizmy biogenezy krótkich RNA

W przeciwieństwie do biogenezy sdRNA podobnej do miRNA, inne doniesienia sugerują przetwarzanie snoRNA w szlaku odpowiedzialnym za powstawanie piRNA. Sugeruje się, że snoRNA są eksportowane do ciałek Cajala, gdzie ulegają enzymatycznemu przycięciu z udziałem enzymu Zucchini (Zuc), po czym następuje przyłączenie domeny PIWI, a snoRNA ulega dalszym obróbkom i jest transportowany do cytoplazmy [234, 235]. Analiza sekwencjonowania RNA zidentyfikowała pięć piRNA pochodzących ze snoRNA należących do klasy C/D, z miejscami cięcia obejmującymi środek sekwencji snoRNA [236].

FUS (ang. *Fused in Sarcoma*) to jądrowe białko wiążące RNA i DNA, które odgrywa kluczową rolę w różnych procesach komórkowych, w tym w transkrypcji, dojrzewaniu mRNA oraz odpowiedzi na uszkodzenia DNA [237]. Gawade i współautorzy zidentyfikowali szereg snoRNA o zróżnicowanym poziomie w komórkach pozbawionych genu *FUS*. Pomimo, że białko FUS nie wykazuje aktywności nukleolitycznej, wyniki te mogą sugerować jego pośredni wpływ na przetwarzanie snoRNA [238]. Inni badacze dowiedli, że białko FUS ma udział w biogenezie konkretnego podzbioru miRNA, poprzez wiązanie do chromatyny w miejscach transkrypcji pri-miRNA, a obniżony poziom FUS w tych miejscach miał związek z obniżonym poziomem DROSHA w tych samych loci. Co więcej, w komórkach o obniżonym poziomie białka FUS odnotowano niższy poziom miR-132, miR-9 i miR-192. Sugeruje się, że białko FUS może być wymagane do rekrutacji DROSHA w określonych miejscach pri-miRNA na wczesnych etapach transkrypcji [239].

1.3.3.2. Potencjalne funkcje sdRNA

W literaturze można znaleźć doniesienia o miRNA pochodzących ze snoRNA i pełniących funkcję w mechanizmie interferencji RNA. Interferencja RNA jest jednym z mechanizmów regulacji ekspresji genów na poziomie posttranskrypcyjnym. Nić przewodnia miRNA łączy się z białkiem AGO2 tworząc kompleks RISC (ang. *RNA-induced silencing complex*), który rozpoznaje i wiąże się z komplementarną sekwencją w docelowym mRNA poprzez parowanie zasad w regionie „seed” obecnym w miRNA. Po związaniu miRNA do docelowego mRNA, RISC może hamować ekspresję genu poprzez degradację mRNA lub hamowanie translacji [240]. Badacze wykazali, że miR-605 nie tylko może pochodzić ze snoRNA z klasy H/ACA, ale także po utworzeniu kompleksu z dyskeriną może brać udział w pseudouracydylacji rRNA [219]. Inni badacze zaobserwowali natomiast, że miR-605 jest zaangażowany w szlak związany z białkiem p53, a zwiększenie jego poziomu spowodowało obniżenie ekspresji MDM2, podczas gdy obniżenie jego poziomu miało odwrotny skutek, co sugeruje, że miR-605 może działać jak miRNA w procesie interferencji RNA [241]. Innymi białkami docelowymi dla miR-605 są INPP4B - fosfataza wymagana do aktywacji onkogenu AKT w czerniaku [242] oraz EN2 - regulator szlaku PI3K/AKT w raku prostaty, pełniąc rolę supresorów w tych nowotworach [243]. Z kolei miR-28 pochodzący ze SNORD28 obniża ekspresję genu TAF9B – białka znanego ze stabilizacji p53. Co więcej, zaobserwowano wysoki poziom zarówno miR-28 jak i jego prekursora w raku piersi [220]. Kolejnym przykładem miRNA pochodzącego ze snoRNA jest miR-1248, którego wysoki poziom odnotowano w GBM [244, 245]. Badacze wykazali również jego potencjalny udział w interferencji RNA w

astrocytach poprzez podwyższenie poziomu OGG1 zaangażowanego w procesy naprawy DNA [246], a także w raku jelita grubego poprzez obniżenie poziomu PSMD10 [247]. Analiza sekwencjonowania krótkich RNA związanych z AGO2 ujawniła natomiast, że sdRNA pochodzące z klasy C/D nie były związane z tym białkiem, co może wskazywać na inną rolę tych cząsteczek [248]. Dowiedziono również, że krótkie RNA potencjalnie mogące pochodzić ze snoRNA, zawierają motywy funkcjonalne obecne w snoRNA, a także mogą tworzyć kompleksy z białkami. Badacze wykazali, że niektóre cząsteczki piRNA pochodzące ze snoRNA posiadają konserwatywne motywy C i D, co może sugerować pełnienie przez nich funkcji w metylacji 2'O-rybozy [236, 249]. Wykazano, że szereg sdRNA pochodzących z klasy C/D snoRNA może brać udział w regulacji splicingu receptora serotoniny 2C [194].

1.3.3.3. SdRNA w nowotworach

W literaturze można znaleźć wiele doniesień o cząsteczkach znanych jako miRNA czy piRNA, ale mogących pochodzić ze snoRNA. Cząsteczki te wykazują zróżnicowany poziom w wielu nowotworach, a pełniąc rolę w procesie interferencji RNA mają wpływ na ich rozwój i progresję. Sekwencjonowanie tkanek pochodzących od pacjentów z rakiem trzustki, zidentyfikowało 18 sdRNA o zróżnicowanym poziomie w tym nowotworze, z czego 4 z nich wykazały wyraźnie wysoki poziom [250]. Z kolei wysokoprzepustowa analiza profilu sdRNA, która obejmowała ponad 10 tysięcy pacjentów i 32 rodzaje nowotworów, nie uwzględniając jednak GBM, pozwoliła na rozróżnienie pacjentów z różnymi typami nowotworów, a także identyfikację poszczególnych podtypów w obrębie jednego nowotworu [251]. Tabela 6 zawiera opisane w literaturze cząsteczki sdRNA niezidentyfikowane wcześniej jako miRNA, a także te znane jako miRNA czy piRNA, pełniące rolę zarówno supresorów jak i onkogenów w nowotworach.

Tabela 6. Wybrane sdRNA o zróżnicowanym poziomie w wybranych nowotworach.

Nazwa miRNA/sdRNA	Nazwa prekursorowej snoRNA	Nowotwór	Działanie	Źródło
sdRNA niezidentyfikowane jako miRNA				
hsa-sno-HBII-296B	SNORD91B	Rak trzustki	Odnotowano niski poziom	[250]
sno-miR-28	SNORD28	Rak piersi	Onkogen Wpływa na destabilizację p53 poprzez obniżenie ekspresji TAF9B	[220]
sdRNA-93	SNORD93	Rak piersi	Onkogen Promuje inwazję komórek	[252]

sdRNA-D19b	SNORD19b	Rak prostaty	Onkogen	Promuje rozwój nowotworu poprzez obniżenie ekspresji CD44 – znanego supresora raka prostaty	[253]
sdRNA-24A	SNORA24	Rak prostaty	Onkogen	Promuje rozwój nowotworu poprzez obniżenie ekspresji CDK12 – znanego supresora raka prostaty	[253]
sdRNA zidentyfikowane jako miRNA					
miR-664	SNORA36B	Rak wątroby	Supresor	Hamuje proliferację, żywotność i inwazję komórek oraz promuje apoptozę	[254]
		Rak jajnika	Supresor	Hamuje wzrost komórek poprzez obniżenie ekspresji c-Myc	[255]
miR-1291	SNORA2C	Rak trzustki	Supresor	Hamuje proliferację poprzez zmniejszenie obniżenie FOXA2, uwrażliwia komórki na chemioterapię	[256, 257]
		Rak nerki	Supresor	Hamuje proliferację, migrację i inwazję poprzez obniżenie ekspresji GLUT1	[258]
		Rak prostaty	Onkogen	Promuje proliferację i tworzenie guzów poprzez obniżenie ekspresji MED1	[259]
miR-1248	SNORA81	Rak prostaty		Odnotowano wysoki poziom	[260]
		Glejak o niskim stopniu złośliwości u dzieci		Odnotowano wysoki poziom na obrzeżach	[261]
		GBM		Odnotowano wysoki poziom	[244, 245]
miR-3651	SNORA84	Rak jelita grubego	Onkogen	Promuje proliferację poprzez obniżenie ekspresji TBX1	[262]
miR-768	SNORD71	Przerzut raka płuc do mózgu	Supresor	Mikrośrodowisko obecne w mózgu wpływa na niski poziom miR-768 i promuje przerzuty raka płuc do mózgu poprzez KRAS	[263]
piRNA pochodzące ze snoRNA					
pi-sno75	SNORD75	Rak piersi	Supresor	Niski poziom pi-sno75 związany jest z niskim poziomem białka TRAIL promującego apoptozę	[264]
pi-sno78	SNORD78	Rak prostaty		Odnotowano wysoki poziom	[265]
piR-017061	SNORD91A	Rak nerki		Odnotowano niski poziom	[250]

2. Materiały i metody

2.1. Odczynniki chemiczne oraz gotowe zestawy odczynników

Tabela 7. Lista odczynników użytych w pracy.

Nazwa odczynnika	Producent, numer katalogowy
PBS	Millipore, 524650-1EA
Opti-MEM	Gibco, 31985062
Trypsyna	Sigma-Aldrich, T4049-100ML
Akutaza StemPro	Thermo Fisher Scientific, A1110501
MACS® Tissue Storage Solution	Miltenyi Biotec, 130-100-008
Medium do mrożenia Cryo-SFM	Sigma-Aldrich, C-29912
TRIzol TRI Reagent® Solution	Invitrogen, AM9738
TRIzol LS Reagent	Invitrogen, 10296010
Chloroform	POCH, 234430427
2-Propanol (Izopropanol)	Sigma-Aldrich, 563935
Agaroz	Sigma-Aldrich, A9539-500G
Kwas borowy	POCH, 531360738
EDTA (kwas wersenowy)	POCH, 593280117
SYBR™ Safe DNA Gel Stain	Thermo Fisher Scientific, S33102
DNA Gel Loading Dye (6X)	Thermo Fisher Scientific, R0611
EtOH	Pol-Aura, 113964200#10L
Igepal CA-630	Supelco, 56741
Inhibitory RNaz	Roche, RNAINH-RO
Sacharoza	BioShop, SUC507.1
Glicerol	Pol-Aura, PA-03-2385-M#1KG
Mocznik	BioShop, URE001
Chlorek sodu	Sigma-Aldrich, S6546
Chlorek magnezu	Sigma-Aldrich, 63069
Tris	Invitrogen, 15504-020
Tris-HCl pH 7,5	Thermo Fisher Scientific, 15567027

Tris-HCl pH 6,8	EURx, E0270-01
Tris-HCl pH 8,8	EURx, E0274-01
Poli-L-Lizyna	Merck, 25988-63-0
Bufor boranowy	Merck, 89273
Formaldehyd	BioShop, FOR201.500
TWEEN 20	Sigma-Aldrich, P9416-50ML
Metanol	Chempur, 116219904
SDS (Dodecylosiarczan sodu)	Pol-Aura, PA-13-BP166#500GR
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	Thermo Fisher Scientific, 26619
Pierce™ ECL Western Blotting Substrate	Thermo Fisher Scientific, 32106
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, SM0311
GeneRuler 100 bp Plus DNA Ladder	Thermo Fisher Scientific, SM0322
Universal Reverse Primer	Agilent, 600037
PVDF Transfer Membrane	Thermo Fisher Scientific, 88518

Tabela 8. Lista gotowych zestawów użytych w pracy.

Nazwa zestawu	Producent, numer katalogowy
DNA-free™ DNA Removal Kit	Thermo Fisher Scientific, AM1906 I
Transcriptor High-Fidelity cDNA Synthesis Kit	Roche, 04379012001
miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit	Agilent, #600036
LightCycler® 480 SYBR Green I Master Mix	Roche, 04707516001
Lipofektamine 2000 Transfection Reagent	Thermo Fisher Scientific, 11668019
Pierce BCA Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, 23227
ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit	Invitrogen, QVC0001
exoEasy Maxi Kit	Qiagen, 76064
CD133 MicroBead Kit	Miltenyi Biotec, 130-100-857

2.2. Oligonukleotydy

Tabela 9. Sekwencje oligonukleotydów do amplifikacji sdrRNA.

Nazwa	Sekwencje starterów (5' → 3')	Temperatura
1_707-5p	Forward GCAGACTCACTATGCACCTG	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
1_707-3p	Forward GTGCTGTGGCTGCCTC	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-664a-5p	Forward ACTGGCTAGGGAAAATGATTGGA	55°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-664a-3p	Forward TATTCATTTATCCCCAGCCTAC	55°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-3653	Forward AGCCTCTAAGAAGTTGACTGAA	55°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
22_10490-3p	Forward CCTCCTGATGATTCTTCTTCCTGA	61,4°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
2_1843-3p	Forward CAGCTGCCTCTCCTCCATC	59°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
3_2423-5p	Forward AGCAGGATTCAGACTACAATAT	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
17_9367-5p	Forward CCTCCTACAAAGGCATGTCT	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
20_10089-5p	Forward CCCCATATACACCTCAGCTC	59°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-664b-3p	Forward TCATTTGCCTCCCAGCCTACA	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-mir-3607-5p	Forward CATGTGATGAAGCAAATCAGT	61,4°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-mir-1248	Forward CCTTCTTGATAAGCACTGTGCTAAA	55,7°C
	Reverse Universal Reverse Primer (Agilent)	

X.111.66	Forward	CTGTTTACAACACACCCAAC	59°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	
20_10199-5p	Forward	TGAAAGCCGTTTCCCGTGTTT	55,7°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	

Tabela 10. Sekwencje oligonukleotydów do amplifikacji snoRNA.

Nazwa	Sekwencje starterów (5' → 3')		Temperatura
SNORA77	Forward	ACTTCCAGGCAGGTGCTTTT	55,7°C
	Reverse	CATCGCCCTGGATAGGTGAG	
SNORA36B	Forward	AGTTCAGTTCAGGGTAGCTT	63,3°C
	Reverse	TCCCTAGCCAGTTTCAATG	
SNORD125	Forward	ATGATTCTTCTTCCTGAGCA	61,4°C
	Reverse	CCCCTTCAGTCAACTTCTTA	
SCARNA6	Forward	GCTTAGTCACAAAGGGATTT	59°C
	Reverse	AGATCATAGCCACAGATACCA	
SNORA63	Forward	CAATATAGCTGCTAAGTGCT	55,7°C
	Reverse	TTTATTTTAAGCAGGGGGAAC	
SNORA38B	Forward	AGGCATGTCTATAGTTCCTTG	63,3°C
	Reverse	CACATTTCTTTGCCTCCAAT	
SNORA51	Forward	ACCTACCCCATATACACCTC	63,3°C
	Reverse	TCCCCCATTCACAATACAG	
SNORA36A	Forward	AAATGGGCTAAGGGAGATGA	63,3°C
	Reverse	CTGGGAGGCAAATGAATAGAA	
SNORD138	Forward	CATGTGATGAAGCAAATCAGT	59°C
	Reverse	CAGAAAGCGTTTACAGTATCATG	
SNORA81	Forward	AAAATTGCAGACACTAGGACCA	55,7°C
	Reverse	AAGAGGTCCACCCAGTCTTT	
SNORA11	Forward	TCCTCTGTTTACAACACACCCA	64,5°C
	Reverse	GGAAGGCCAAAGTATCATGCC	

SNORA60	Forward	TGCTCTGGTCATCAATAACG	59°C
	Reverse	AAACGGCTTTCAGCAATTC	

Tabela 11. Sekwencje oligonukleotydów do amplifikacji wybranych transkryptów oraz miRNA.

Nazwa	Sekwencje starterów (5' → 3')		Temperatura
pre-miR-1248	Forward	GACACTAGGACCATGTCTTG	55,7°C - 64,5°C
	Reverse	TGCTGTTACTTTTCTTCTTGTGTG	
HPRT	Forward	TGACCTTGATTTTGCATAACC	55,7°C - 64,5°C
	Reverse	CGAGCAAGACGTTTCAGTCCT	
SDHA	Forward	CCTTTCTGAGGCAGGGTTTA	55,7°C - 64,5°C
	Reverse	ATTTTCTAGCTGTGCTGCAA	
R18S	Forward	CGCCGCTAGAGGTGAAATTC	55,7°C - 64,5°C
	Reverse	CATTCTTGGCAAATGCTTTCG	
ATP2B4	Forward	ATGACGAACCCATCAGACCG	63,3°C
	Reverse	TCAGTGCATCCCTTGAACGC	
EIF4A2	Forward	TGGTGTTCATCGAGAGCAACTG	63,3°C
	Reverse	GGCTTCTCAAACCGTAAGCA	
GAPDH intron	Forward	GTCCCCAGAAACAGGAGGTC	61,4°C
	Reverse	AAGAAAGCGTCCCCACCTA	
GAPDH ekson - ekson	Forward	GAAAGCCTGCCGGTGAATAA	61,4°C
	Reverse	GCCCAATACGACCAAATCAGAGA	
GLUT	Forward	TTGCAGGCTTCTCCAAGTGGAC	63°C
	Reverse	CAGAACCAGGAGCACAGTGAAG	
PDK1	Forward	CTGTGATACGGATCAGAAACCG	63°C
	Reverse	TCCACCAAACAATAAAGAGTGCT	
OCT-4	Forward	GTGGAGAGCAACTCCGATG	63°C
	Reverse	TGCTCCAGCTTCTCCTTCTC	
NANOG	Forward	ATTCAGGACAGCCCTGATTCTTC	63°C
	Reverse	TTTTTGCACACTCTTCTCTGC	

SOX2	Forward	CGAGTGGAAACTTTTGTTCGGA	63°C
	Reverse	TGTGCAGCGCTCGCAG	
FUS	Forward	ATGGCCTCAAACGATTATACCCA	64,5°C
	Reverse	GTA ACTCTGCTGTCCGTAGGG	
DROSHA	Forward	TGTCACAGAATGTCGTTCCAC	60°C
	Reverse	GGGCCTAAAGGATGGTGCT	
AGO2	Forward	TCCACCTAGACCCGACTTTGG	60°C
	Reverse	GTGTTCCACGATTTCCCTGTT	
hsa-miR-21	Forward	TAGCTTATCAGACTGATGTTGA	60°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-106a	Forward	AAAAGTGCTTACAGTGCAGGTAG	60°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-20a	Forward	TAAAGTGCTTATAGTGCAGGTAG	60°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	
hsa-miR-181b	Forward	AACATTCATTGCTGTCGGTGGGT	60°C
	Reverse	Universal Reverse Primer (Agilent)	

2.3. Analiza wyników sekwencjonowania RNA

Biblioteki do sekwencjonowania krótkich RNA zostały przygotowane w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej ICHB PAN w roku 2012 z użyciem protokołu firmy Applied Biosystems Incorporated (ABI). Analizę przeprowadzono na aparacie SOLiD V4 przez firmę Sequomics Biotechnology Ltd. z siedzibą w Szeged, Węgry. Sekwencjonowaniu RNA zostały poddane tkanki pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (n = 4) pozyskane w latach 2010 – 2011. Analiza danych sekwencjonowania została wykonana przez dr hab. Marka Żywickiego, prof. UAM (Zakład Biologii Obliczeniowej). W skrócie, adaptory zostały usunięte przy pomocy narzędzia CutAdapt (<http://journal.embnet.org/index.php/embnetjournal/article/view/200>), a następnie dane zostały zmapowane do ludzkiego genomu GRCh37. Kolejno w celu uzyskania cząsteczek sdRNA, wykorzystano narzędzie miRDeep2 w wersji 2.0.0.5 [266], wyodrębniono sekwencje dojrzałych cząsteczek wraz z ich prekursorami, a następnie porównano ze znanymi miRNA z

bazy danych miRBase [267, 268]. Dane sekwencjonowania obejmujące cząsteczki miRNA zostały opublikowane w 2015 roku w czasopiśmie *Molecular Oncology* [269].

2.4. Tkanki oraz próbki krwi pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM

Tkanki oraz próbki krwi pochodzące od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM zostały pozyskane z Katedry i Kliniki Neurochirurgii i Neurotraumatologii na Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu oraz Kliniki Neurochirurgii w Wielodyscyplinarnym Szpitalu Miejskim w Poznaniu. Zgoda na użycie tkanek GBM oraz próbek krwi w celach badawczych została wydana przez Komisję Bioetyczną przy Uniwersytecie Medycznym w Poznaniu (nr zgody 534/18), dodatkowo od każdego pacjenta pozyskano świadomą zgodę na wykorzystanie wyżej wymienionego materiału. Pozyskane podczas standardowej resekcji fragmenty tkanek GBM, zanurzone zostały w buforze do przechowywania tkanek (MACS® Tissue Storage Solution), a następnie w ciągu kilku godzin dostarczone do laboratorium i zamrożone poprzez zanurzenie w ciekłym azocie. Tak przygotowany do dalszych analiz materiał był przechowywany w -80°C. Krew została pobrana od pacjentów przed operacją i przechowywana w EDTA w temperaturze 4°C, a następnie dostarczona do laboratorium w ciągu kilku godzin, gdzie od razu przeprowadzono izolację RNA z próbek krwi. Charakterystyka tkanek i próbek krwi pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM pozyskanych w celu oceny poziomu cząsteczek RNA została zamieszczona w Tabeli 12 i Tabeli 13. Kontrolę stanowiły komercyjnie dostępne próbki, będące mieszaniną RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu opisane w Tabeli 14.

Tabela 12. Charakterystyka tkanek pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (K – kobieta, M – mężczyzna).

Nazwa próbki GBM	Płeć	Wiek	Symptomy		Lokalizacja guza (półkula)		Zakres resekcji		Podtyp
			Ból głowy	Afazja	Prawa	Lewa	Całkowita	Częściowa	
GBM 1	K	58		X		X	X		Klasyczny
GBM 2	K	63			X		X		Mezenchymalny
GBM 3	M	52	X		X		X		Proneuralny
GBM 4	M	62			X		X		Mezenchymalny
GBM 5	M	83		X	X		X		Proneuralny

GBM 6	K	74	X	X	X		X	Klasyczny
GBM 7	M	68			X		X	Brak danych
GBM 8	K	74				Brak danych		Klasyczny
GBM 9	K	73				Brak danych		Brak danych
GBM 10	K	63		X		X	X	Brak danych
GBM 11	M	51				Brak danych		Mezenchymalny
GBM 12	M	52		X		X	X	Proneuralny

Tabela 13. Charakterystyka próbek krwi pobranych od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (K – kobieta, M – mężczyzna).

Nazwa próbki GBM	Płeć	Wiek	Symptomy		Lokalizacja guza (półkula)		Zakres resekcji		Podtyp
			Ból głowy	Afazja	Prawa	Lewa	Całkowita	Częściowa	
Pacjent 1	M	49		X		X	X		Brak danych
Pacjent 2	M	49				X	X		Brak danych
Pacjent 3	M	64	X		X		X		Brak danych
Pacjent 4	K	49				Brak danych			Brak danych

Tabela 14. Charakterystyka próbek RNA pochodzących ze zdrowego mózgu.

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

2.5. Hodowle komórkowe

Hodowlę komórkową prowadzono w sterylnych warunkach, z użyciem komory laminarnej z poziomym przepływem powietrza. Linie komórkowe były hodowane w inkubatorach zapewniających optymalne warunki wzrostu komórek zwierzęcych: temperatura 37°C, wilgotność 95%, stężenie CO₂ 5%, chyba że podano inaczej. Wykorzystane do badań linie komórkowe hodowano na butelkach do hodowli komórkowych o pojemności 75 cm² i 25 cm² oraz płytkach 6-dołkowych do osiągnięcia 80% konfluencji. Po osiągnięciu 80% konfluencji komórki poddawano pasażowi. W tym celu komórki przemywano sterylnym PBS, a w celu odklejenia komórek od naczyń hodowlanych, dodawano 2 ml 1% trypsyny i inkubowano 3-5 minut w 37°C. Następnie trypsynę inaktywowano poprzez dodanie 4 ml suplementowanej pożywki, a całość wirowano przez 3 min. przy 200 RCF w temperaturze pokojowej. Media hodowlane przechowywano temperaturze 4°C i podgrzewano do temperatury 37°C bezpośrednio przed użyciem. Linie komórkowe były zawieszane w CryoSFM (Sigma-Aldrich) i stopniowo schładzane przez 24 godziny w łaźni wypełnionej izopropanolem w temperaturze -80°C celem ich długoterminowego przechowania. Ostatecznie zamrożone kultury komórkowe umieszczano w oparach ciekłego azotu. Skład użytych do poszczególnych hodowli mediów hodowlanych został podany w Tabeli 15, natomiast linie komórkowe użyte podczas przygotowania pracy wraz z warunkami hodowli zostały zamieszczone w Tabeli 16.

Tabela 15. Skład pożywek stosowanych podczas hodowli komórkowych.

Składnik	Producent, numer katalogowy	Ilość na 50 ml gotowej pożywki
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	LGC Standards, ATCC-30-2002	44 ml
Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM)	LGC Standards, ATCC-30-2003	
FBS	EURx, E5050	5 ml
Roztwór penicyliny/ streptomycyny (100x)	Thermo Fisher Scientific, 10378016	1 ml

Tabela 16. Lista linii komórkowych użytych podczas pracy oraz warunki ich hodowli.

Linia komórkowa	Pochodzenie komórek	Medium hodowlane	Warunki hodowli	Producent
U118-MG	Glejak	DMEM 10% FBS 1% antybiotyki		
U251-MG	Glejak			
U87-MG	Glejak		5% CO ₂ , 37°C, 95% wilgotności	American Type Culture Collection (ATCC)
Hep G2	Rak wątroby	EMEM 10% FBS		
Caco-2	Rak jelita grubego	1% antybiotyki		
MRC-5	Fibroblasty płucne			
HEK-293	Endotelium nerki			

2.6. Izolacja całkowitego RNA

Zarówno linie komórkowe jak i tkanki pochodzące od pacjentów zostały poddane izolacji całkowitego RNA z użyciem odczynnika TRIzol Reagent (Invitrogen). Przed przystąpieniem do izolacji RNA, usunięto medium hodowlane z płytek, na których rosły komórki, a następnie przepłukano PBS i dodano 500 µl TRIzolu. Fragmenty tkanek pochodzące od pacjentów z GBM zostały poddane homogenizacji przy użyciu homogenizatora mechanicznego z regulowaną siłą rozdrabniania (PRO Scientific Inc.) w obecności 700 µl TRIzolu. Po dodaniu TRIzolu próby inkubowano przez 10 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno dodano 100 µl chloroformu i wytrząsano ręcznie przez 15 sekund. Rozdzielenie frakcji wodnej i organicznej nastąpiło przez wirowanie przy 12 500 RPM przez 15 minut w 4°C. Następnie ostrożnie przeniesiono fazę wodną zawierającą kwasy nukleinowe do nowej probówki o pojemności 1,5 ml. Do fazy wodnej dodano ekwiwalentną ilość izopropanolu i wymieszano obracając probówkę kilka razy. Próby inkubowano w -20°C przez 20 minut, a następnie wirowano przy 12 500 RPM przez 8 minut w 4°C. Supernatant usunięto, a do osadu dodano 1 ml zimnego 80% etanolu. Próby następnie zworteksowano i zwirowano w 7500 RPM przez 10 minut w 4°C oraz usunięto supernatant. Osad poddawano suszeniu w temperaturze pokojowej, a następnie dodano 15 µl sterylnej, podwójnie destylowanej wody. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ 260 nm, a jego integralność sprawdzono przez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym.

2.7. Oczyszczanie całkowitego RNA z zanieczyszczeń DNA

Wyizolowane całkowite RNA poddano trawieniu DNazą przy użyciu gotowego zestawu odczynników DNA-free™ DNA Removal Kit (Invitrogen), zgodnie z dołączoną przez producenta procedurą. W celu zapobieżenia degradacji RNA, przez cały czas przeprowadzania reakcji, z wyłączeniem czasu inkubacji, próby trzymano na lodzie. Proces rozpoczęto od przygotowania w probówkach o pojemności 1,5 ml mieszaniny reakcyjnej, w której skład wchodzi: 1 µl enzymu rDNase I, 1 µl buforu (10x DNase I Buffer), RNA o stężeniu 5000 ng/ml. Następnie całość dopełniono sterylną, podwójnie destylowaną wodą do całkowitej objętości 10 µl. Tak przygotowaną mieszaninę inkubowano 20-30 min w 37°C. Następnie do prób dodano 1 µl inaktywatora (DNase Inactivation Reagent) i inkubowano 2 minuty w temperaturze pokojowej, czasem mieszając. Kolejną całość wirowano przy 7500 RPM przez 1,5 minuty w temperaturze 4°C. Faza wodna zawierająca oczyszczony RNA została przeniesiona do nowych probówek o objętości 1,5 ml. Stężenie oczyszczonego RNA zmierzono z użyciem spektrofotometru przy długości fali λ 260 nm. W celu sprawdzenia jakości uzyskanego RNA przeprowadzono rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym.

2.8. Rozdział elektroforetyczny kwasów nukleinowych w żelu agarozowym

Elektroforeza RNA została przeprowadzona w 1% żelu agarozowym, w którego skład wchodzi 50 ml buforu TBE 1x oraz 0,5 g agarozy, wybarwionym za pomocą 4 µl barwnika SYBR®Safe DNA Gel Stain (Thermo Fisher Scientific). Skład buforu do elektroforezy kwasów nukleinowych został podany w Tabeli 17. Do każdej z kieszonek nałożono 10 µl mieszaninę zawierającą 500 ng RNA, 2 µl buforu DNA Gel Loading Dye (Thermo Fisher Scientific) oraz sterylną, podwójnie destylowaną wodę. Elektroforeza została przeprowadzona przy natężeniu równym 75 mA i napięciu wynoszącym 300 V przez 30 min. Wizualizacja była możliwa dzięki wykorzystaniu systemu detekcji żeli G-BOX CHEMI XR5 (Syngene).

Tabela 17. Skład buforu do elektroforezy kwasów nukleinowych TEB (10x) pH 8,3.

Bufor TBE (10x) pH 8,3	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris-HCl	500 mM
Kwas borowy	500 mM
EDTA	10 mM

2.9. Reakcja odwrotnej transkrypcji

Reakcja odwrotnej transkrypcji przeprowadzona została z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit (Roche), zgodnie z procedurą zalecaną przez producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji zostały umieszczone w Tabeli 18. Z wyjątkiem podanych w Tabeli 18 czasów inkubacji, próby przez cały proces trzymano na lodzie. Otrzymany cDNA rozcieńczono przez dodanie 20 μl sterylnej, podwójnie destylowanej wody.

Tabela 18. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji odwrotnej transkrypcji.

Etap	Składnik	Ilość	Warunki
Przylączenie starterów	RNA	500 ng	10 minut w 65°C, schłodzenie na lodzie
	Mieszanina starterów (600 pmol/ μl)	2 μl	
	Sterylna, podwójnie destylowana woda	do 13 μl	
Odwrotna transkrypcja	Bufor (5x)	4 μl	10 minut w 25°C, 60 minut w 50°C
	Miks deoksynukleotydów (10 mM)	2 μl	
	Inhibitory RNaz 40U/ μl	0,5 μl	
	Enzym odwrotna transkryptaza 20U/ μl	0,5 μl	
Inaktywacja enzymów	-	-	5 minut w 85°C

2.10. Reakcja poliadenylacji i odwrotna transkrypcja

W celu oceny poziomu sdRNA, oczyszczone RNA zostało poddane reakcji poliadenylacji a następnie odwrotnej transkrypcji. W tym celu wykorzystano gotowy zestaw odczynników miRNA 1st-Strand cDNA Synthesis Kit (Agilent Technologies), stosując procedurę zalecaną przez producenta. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 19. Po zakończeniu kolejnych cykli inkubacji, próby zostały przeniesione na lód a następnie dodano do każdej z nich 130 μl sterylnej, podwójnie destylowanej wody.

Tabela 19. Skład mieszaniny reakcyjnej oraz warunki reakcji poliadenylacji RNA oraz odwrotnej transkrypcji.

Etap	Składnik	Ilość	Warunki
Reakcja poliadenylacji	RNA	500 ng	30 minut w 37°C, 5 minut w 95°C, schłodzenie na lodzie
	Bufor (5x)	2 µl	
	rATP (10 mM)	0,5 µl	
	Polimeraza poli(A)	0,5 µl	
	Sterylna, podwójnie destylowana woda	do 10 µl	
Odwrotna transkrypcja	Poliadenylowane RNA	2 µl	5 minut w 55°C, 15 minut w 25°C, 30 minut w 42°C
	Bufor (10x)	1 µl	
	Miks deoksynukleotydów (100 mM)	0,4 µl	
	Miks starterów (10 µM)	0,5 µl	
	Mieszanina enzymów	0,5 µl	
	Sterylna, podwójnie destylowana woda	5,6 µl	
Inaktywacja enzymów	-	-	5 minut w 95°C

2.11. Frakcjonowanie subkomórkowe RNA

Izolacja frakcji subkomórkowych (cytoplazmatycznej oraz jądrowej) została wykonana zgodnie z protokołem opisanym przez Conrad i Ørom [270]. Komórki GBM w liczbie 5×10^6 przemyto w PBS i inkubowano z roztworem trypsyny w temperaturze 37°C przez 5 minut. Reakcję trypsynizacji zatrzymano dodając 10 ml zimnego medium komórkowego. Następnie komórki wirowano przy 200 RCF przez 5 minut oraz dwukrotnie przepłukiwano zimnym PBS i wirowano przy 200 RCF kolejno przez 5 minut i 2 minuty. Tak przygotowany osad komórkowy poddano lizie zimnym buforem Igepal i inkubowano przez 5 minut. Aby wyizolować frakcję cytoplazmatyczną i jądrową, lizat komórkowy nałożono na zimny bufor sacharozowy i wirowano przy 3500 RCF przez 10 minut. Skład buforu do lizy został przedstawiony w Tabeli 20, a buforu sacharozowego w Tabeli 21. Następnie supernatant zawierający frakcję cytoplazmatyczną wirowano przy 14 000 RCF przez 1 minutę, a osad zawierający jądra przepłukano 1 ml zimnym PBS-EDTA, którego skład podano w Tabeli 22 i wirowano przy 3500 RCF przez 5 sekund. Wszystkie cykle wirowań przeprowadzono w temperaturze 4°C, a każdą inkubację na lodzie. Przygotowane buforu zostały przefiltrowane z użyciem filtrów 0,22 µm (Corning, 430624). Bezpośrednio przed użyciem, do buforów został

dodany inhibitor RNAz (Merck). Połowa materiału z wyizolowanych prób zawierających osad jądrowy została przeznaczona do izolacji RNA, natomiast druga połowa do izolacji frakcji RNA związanych z chromatyną. W celu izolacji RNA z frakcji jądrowej oraz cytoplazmatycznej, dodano 1 ml odczynnika TRIzol na każde 200 µl ekstraktu cytoplazmatycznego i do osadu jądrowego. Dodatkowo, w celu rozbicia osadu jądrowego został on przepuszczony kilka razy przez igłę o rozmiarze 21G za pomocą strzykawki o pojemności 2 ml.

Tabela 20. Skład buforu do lizy komórek.

Bufor do lizy Igepal	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
Igepal CA-360	0,15%
Inhibitory RNAz (Merck)	20 U/ml

Tabela 21. Skład buforu sacharozowego.

Bufor sacharozowy	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	10 mM
NaCl	150 mM
Sacharoza	24%
Inhibitory RNAz (Merck)	20 U/ml

Tabela 22. Skład buforu PBS-EDTA.

Bufor PBS-EDTA	
Składnik	Stężenie końcowe
PBS	1x
EDTA pH 8,0	500 mM

2.12. Izolacja frakcji RNA związanych z chromatyną

Aby rozdzielić frakcję jądrową na nukleoplazmę i chromatynę, do osadu frakcji jądrowej pozyskanego według opisu w punkcie 2.11. dodano 250 µl buforu glicerolowego, a następnie 250 µl buforu do lizy zawierającego mocznik. Składy buforów zostały podane w Tabeli 23 i Tabeli 24. Kolejno próby wortexowano przez 4 sekundy i inkubowano na lodzie przez 2 minuty. Aby wytrącić kompleks chromatyna-RNA, próby wirowano przy 13 000 RCF przez 2 minuty. Supernatant zawierający nukleoplazmę przeniesino do nowej probówki i dodano 1 ml TRIzol na 200 µl ekstraktu nukleoplazmatycznego w celu izolacji RNA. Osad zawierający chromatynę przepłukano buforem PBS-EDTA, a następnie aby wyizolować RNA związane z chromatyną dodano 1 ml TRIzol. W celu rozpuszczenia osadu, został on przepuszczony kilka razy przez igłę o rozmiarze 21G za pomocą strzykawki o pojemności 2 ml.

Tabela 23. Skład buforu glicerolowego.

Bufor glicerolowy	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	20 mM
NaCl	75 mM
EDTA	0,5 mM
Glicerol	50%

Tabela 24. Skład buforu do lizy z mocznikiem.

Bufor do lizy z mocznikiem	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	10 mM
Mocznik	1 M
NaCl	0,3 M
MgCl ₂	7,5 mM
EDTA	0,2 mM
Igepal CA-360	1%

2.13. Frakcjonowanie subkomórkowe białek

Frakcjonowanie subkomórkowe białek na frakcję jądrową i cytoplazmatyczną zostało przeprowadzone przy użyciu gotowego zestawu odczynników NE-PER Nuclear and Cytoplasmic Extracion Reagents (ThermoFisher Scientific) według protokołu zamieszczonego przez producenta. Osad (2×10^6 komórek) pochodzący z linii GBM poddano wirowaniu przy najwyższych obrotach przez 15 sekund w 4°C a następnie inkubowano na lodzie przez 10 minut. Kolejno dodano schłodzony bufor CER II, zworteksowano przez 5 sekund i poddano inkubacji na lodzie przez 1 minutę. Następnie próby ponownie worteksowano przez 5 sekund i wirowano przy 16 000 RCF przez 5 minut w 4°C . Supernatant stanowiący frakcję cytoplazmatyczną przeniesiono do wcześniej schłodzonej probówki typu eppendorf i zamrożono w -80°C . Do osadu stanowiącego frakcję jądrową dodano 100 μl schłodzonego bufora NER, worteksowano przez 15 sekund a następnie inkubowano przez 40 minut na lodzie, worteksując próby przez 15 sekund co każde 10 minut. Kolejno próby wirowano przy 16 000 RCF przez 10 minut w 4°C . Supernatant stanowiący frakcję jądrową przeniesiono do wcześniej schłodzonej probówki typu eppendorf i zamrożono w -80°C . W celu izolacji białek do prób dodano 500 μl buforu 10 mM Tris-HCl pH 7,5. Poprawność przeprowadzonego frakcjonowania potwierdzono przez analizę typu Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko markerowi jądrowemu - histonowi H3.

2.14. Indukcja hipoksji

W celu indukcji hipoksji, komórki GBM (5×10^5) poddawane były warunkom niedoboru tlenu (około 1 % O_2) przez 5 dni w inkubatorze. Kontrolę stanowiły komórki hodowane w inkubatorze w standardowych warunkach ze stężeniem tlenu wynoszącym około 19 %. Po 5 dniach z komórek wyizolowano całkowite RNA. Niedobór tlenu potwierdzono poprzez ocenę poziomu markerów hipoksji (GLUT, PDK1) za pomocą ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy (qPCR, ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*) oraz metody Western Blot.

2.15. Magnetyczna separacja frakcji komórek macierzystych GBM (GSC)

Z linii komórkowej U-251 MG utworzono trójwymiarowe struktury (neurosfer) zgodnie z protokołem opracowanym przez Vinci i współpracowników [271]. Komórki hodowano w medium, którego skład został podany w Tabeli 25. W celu wzbogacenia frakcji GSC, neurosfery hodowano przez dwa tygodnie, a następnie poddano separacji magnetycznej.

Separacja opiera się na kulkach magnetycznych znakowanych przeciwciałem CD133, rozpoznającym epitop 1 antygeny CD133 znajdujące się na powierzchni komórek GSC. Separacja magnetyczna przeprowadzona została z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników CD133 MicroBead Kit (Miltenyi Biotec) zgodnie z protokołem zamieszczonym przez producenta zestawu. Komórki delikatnie zdysocjowano za pomocą akutazy (StemPro), znakowano kulkami magnetycznymi z przeciwciałem i rozdzielono przy użyciu wcześniej przygotowanych kolumn LS. Uzyskane frakcje – populację GSC (frakcja CD133+) i przepływ stanowiący kontrolę, poddano izolacji RNA. Poprawność wyizolowanej frakcji potwierdzono poprzez ocenę poziomu markerów GSC (OCT-4, NANOG, SOX2).

Tabela 25. Skład pożywki hodowlanej do neurosfer.

Składnik	Producent, numer katalogowy	Ilość na 50 ml gotowej pożywki
DMEM F12	Thermo Fisher Scientific, 11320033	48 ml
B27	Thermo Fisher Scientific, 17504044	1 ml
N2	Thermo Fisher Scientific, 17502048	500 µl
Rozwórt penicyliny/streptomycyny 100x	Thermo Fisher Scientific, 10378016	500 µl
Czynnik wzrostu fibroblastów (FGF)	Thermo Fisher Scientific, PHG0261	0,7 µl na 1 ml pożywki
Czynnik wzrostu naskórka (EGF)	Sigma-Aldrich, E5036-500UG	0,7 µl na 1 ml pożywki

2.16. Łańcuchowa reakcja polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR)

Aby ocenić poziom badanych snoRNA, sdRNA oraz wybranych transkryptów zastosowano metodę ilościowej reakcji łańcuchowej polimerazy w czasie rzeczywistym (qPCR, ang. *quantitative Polymerase Chain Reaction*). Matrycę dla amplifikacji cząsteczek snoRNA oraz wybranych mRNA stanowiło cDNA otrzymane na drodze odwrotnej transkrypcji, natomiast dla cząsteczek sdRNA, cDNA poddane reakcji poliadenylacji oraz odwrotnej transkrypcji. Procedurę rozpoczynano od przygotowania mieszanin reakcyjnych, których skład podano w Tabeli 26. W celu amplifikacji cząsteczek sdRNA, starter reverse stanowił uniwersalny starter komplementarny do poliadenylowanej sekwencji (Agilent Technologies).

Tabela 26. Skład mieszaniny reakcyjnej do reakcji qPCR.

Amplifikacja snoRNA oraz mRNA		Amplifikacja sdRNA	
Składnik	Ilość	Składnik	Ilość
LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl	LightCycler® 480 SYBR Green I Master	5 µl
Starter Forward (5 µM)	1 µl	Starter Forward (5 µM)	1 µl
Starter Reverse (5 µM)	1 µl	Universal Reverse Primer (3,125 µM)	1,4 µl
Woda	2 µl	Woda	1,6 µl
Matryca cDNA	1 µl	Matryca cDNA	1 µl

Reakcję qPCR przeprowadzano przy użyciu termocyklera CFX96 Real-Time System na 96-dołkowych płytkach z przezroczystym dnem (BioRad). Przed umieszczeniem gotowej płytki w termocyklerze, zaklejano ją uszczelnioną termicznie folią (BioRad) i wirowano 1 min przy 1000 RPM. Warunki reakcji przedstawiono w Tabeli 27. Analizę ilościową względem genów referencyjnych przeprowadzono metodą kwantyfikacji względnej ($\Delta\Delta C_t$) z użyciem dołączonego do termocyklera oprogramowania (CFX Maestro Software). Każda próbka cDNA analizowana była trzykrotnie. Genami referencyjnymi dla snoRNA oraz wybranych transkryptów były *HPRT* oraz *SDHA*, natomiast dla cząsteczek sdRNA *R18S*. 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 ustalono za pomocą zastosowania gradientu temperaturowego. Jakość uzyskanych produktów PCR sprawdzono poprzez analizę krzywych topnienia oraz za pomocą elektroforezy w żelu agarozowym.

Tabela 27. Warunki reakcji qPCR.

Etap	Temperatura	Czas	Powtórzenia	
Denaturacja wstępna	95°C	3 minuty	1	
Amplifikacja	Denaturacja	95°C	15 sekund	
	Przyłączanie starterów	55°C - 65°C	30 sekund	40
	Elongacja	72°C	20 sekund	
Oznaczenie krzywej topnienia	65°C - 95°C	0,5°C co 5 sekund	1	
Chłodzenie	4°C	∞	1	

2.17. Manipulacja poziomem białka FUS

Dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu kierowanego przez dr hab. Dorotę Raczyńską, prof. UAM, pozyskano RNA z linii komórkowej U-87 MG, która została pozbawiona genu *FUS* z użyciem techniki CRISPR/Cas9 [238]. Pozyskane RNA zostało następnie DNazowaniu, a jego jakość oceniono poprzez rozdział elektroforetyczny w żelu agarozowym. Następnie przeprowadzono reakcję odwrotnej transkrypcji oraz reakcję poliadenylacji i odwrotnej transkrypcji celem oceny poziomu cząsteczek snoRNA i sdRNA z wykorzystaniem qPCR. Również dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów pozyskano wektor do nadekspresji genu *FUS*.

2.18. Transfekcja komórek GBM plazmidem do nadekspresji genu *FUS*

W celu dostarczenia wektora do nadekspresji genu *FUS* do komórek, zastosowano metodę transfekcji z wykorzystaniem Lipofektaminy 2000 (Thermo Fisher Scientific). Komórki wysiewano na płytki 6-dołkowe w liczbie 2×10^5 /dołek. Po 24 godzinach komórki poddano transfekcji plazmidem ekspresyjnym *FUS* o stężeniu 250 ng oraz 500 ng. W tym celu przygotowano dwie mieszaniny, których skład podano w Tabeli 28.

Tabela 28. Skład mieszaniny transfekcyjnej.

Mieszanina I			Mieszanina II		
Składnik	Producent, nr katalogowy	Ilość na 1 próbę	Składnik	Producent, nr katalogowy	Ilość na 1 próbę
Plazmid	-	250 ng / 500 ng	Lipofektamina 2000	Invitrogen, 11668019	3 μ l
Opti-MEM	Gibco, 31985062	do 100 μ l	Opti-MEM	Gibco, 31985062	97 μ l

Przygotowane mieszaniny I i II inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej, następnie obie mieszaniny połączono i inkubowano kolejne 20 minut w temperaturze pokojowej. W trakcie inkubacji, medium komórkowe zostało zmienione na niesuplementowane. Przygotowaną mieszaninę reakcyjną dodawano do komórek w ilości 200 μ l/dołek. Kontrolę negatywną stanowiły komórki poddane transfekcji mieszaniną II niezawierającą plazmidu. Komórki hodowano przez 48 oraz 72 godziny, po czym poddawano je izolacji całkowitego RNA i białek.

2.19. Analiza Western Blot

Komórki GBM poddawano trypsynizacji a osad przemywano buforem PBS i wirowano 3 minuty przy 200 RCF. Po usunięciu supernatantu osad zawieszano w 500 μ l buforu 10mM Tris-HCl pH 7,5 suplementowanego inhibitorami proteaz i poddawano sonikacji w następujących warunkach: 3×10 sekund z 30-sekundową przerwą pomiędzy cyklami sonikacji przy amplitudzie 80% na lodzie. Kolejno próby wirowano przez 10 minut przy 10 000 RPM w 4°C. Supernatant przenoszono do nowej probówki typu eppendorf, a osad wyrzucano. Stężenie białka mierzono kolorymetrycznie za pomocą metody BCA (Thermo Fisher Scientific). Przed nałożeniem na żel, do każdej z prób dodawano 5 μ l buforu obciążającego (EURx), a następnie inkubowano w 95°C przez 10 minut. Na żel poliakrylamidowy o procentowości równej 10 % lub 12 %, których skład podano w Tabeli 29, nakładano odpowiednią ilość białka.

Tabela 29. Skład żeli poliakrylamidowych do rozdzielania elektroforetycznego białek.

Składnik	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 przy napięciu 75 V przez 15 minut, a następnie przy 125 V przez 2 godziny w temperaturze pokojowej w buforze do elektroforezy białek, którego skład został podany w Tabeli 30. Wielkość białka oznaczano na podstawie rozdzielania markera PageRulerTM Prestained Protein Ladder Plus (Thermo Fisher Scientific). Rozdzielone białka przenoszone były na membranę PVDF (Thermo Fisher Scientific) w procesie elektrotransferu z wykorzystaniem urządzenia Western Unity (BioRad) przez 30-60 min (w zależności od wielkości białka) w buforze do transferu, którego skład podano w Tabeli 31 w temperaturze 4°C przy stałym natężeniu 130 mA. Następnie membranę przepłukiwano 3×5 minut w buforze TBST, którego skład podano

w Tabeli 32 i blokowano w 5% roztworze mleka w TBST przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce.

Tabela 30. Skład buforu do rozdzielania elektroforetycznego białek (10x).

Bufor do elektroforezy białek	
Składnik	Stężenie końcowe
Glicyna	1,9 M
Tris-HCl (pH 7,5)	250 mM
SDS	35 mM

Tabela 31. Skład buforu do transferu białek (10x).

Bufor do transferu białek	
Składnik	Stężenie końcowe
Glicyna	190 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	25 mM
Metanol	20%

Tabela 32. Skład buforu TBST.

Bufor TBST	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris	4,6 mM
Tris-HCl (pH 7,5)	20 mM
Chlorek sodu	15 mM
TWEEN 20	1%

Membranę inkubowano z monoklonalnym przeciwciałem pierwszorzędowym specyficznym wobec badanych białek przez noc w temperaturze 4°C na wytrząsarce. Następnego dnia membranę przepłukiwano 3 × 5 minut w buforze TBST, kolejno inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej na wytrząsarce z przeciwciałem drugorzędowym sprzężonym z peroksydazą chrzanową (w zależności od gatunku, z którego pochodziło przeciwciało pierwszorzędowe). Spis przeciwciał użytych w niniejszej pracy wraz z

zastosowanym rozcieńczeniem został podany w Tabeli 33. Po przepłukaniu membrany 3×5 minut w buforze TBST, dodano 2 ml substratu ECL i inkubowano w ciemni przez 2 minuty. Detekcji sygnału chemiluminescencyjnego dokonywano z wykorzystaniem systemu Alliance Q9 (Uvitec Cambridge), a intensywność prążków oceniano densytometrycznie przy wykorzystaniu programu ImageJ (<https://imagej.net/ij/>).

Tabela 33. Spis przeciwciał użytych w niniejszej pracy.

Nazwa przeciwciała	Producent, nr katalogowy	Rozcieńczenie
Anty-FUS	Invitrogen, PA5-96477	1:1 000
Anty-DROSHA	Abcam, AB12286	1:2 000
Anty-AGO2	Abcam, AB186733	1:1 500
Anty-Histon 3	Abcam, AB1791	1:2 500
Anty-CD63	Proteintech, 67605-1-Ig	1:7 500
Anty-PDK1	Invitrogen, MA5-32702	1:1 000
Anty-GLUT	Invitrogen, MA5-31960	1:1 000
Anty-GAPDH	Abcam, AB185059	1: 500
Drugorzędowe anty-mysie	Sigma Aldrich, A9044	1:10 000
Drugorzędowe anty-królicze	Sigma Aldrich, A6154-ML	1:10 000

2.20. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH)

Mikroślonyki Ibidi z usuwalnymi silikonowymi ściankami do hodowli komórkowych i obrazowania (Animalab, 80841) pokryto 300 μ l roztworem Poli-L-Lizyny (Merck) w buforze boranowym, następnie inkubowano przez 3 godziny w 37°C i przepłukano 3-krotnie sterylną, podwójnie destylowaną wodą oraz 1-krotnie buforem PBS. Fluorescencyjna hybrydyzacja *in situ* (FISH, ang. *Fluorescent In Situ Hybridization*) została wykonana zgodnie z protokołem opisanym przez producenta z użyciem ViewRNA™ ISH Cell Assay Kit (Thermo Fisher Scientific). Na mikroślonyki pokryte Poli-L-Lizyną (Merck) wysiano komórki GBM w liczbie $3,5 \times 10^4$ /dołek na 24 godziny przed planowanym eksperymentem. Następnego dnia usunięto medium, a komórki przepłukano 2-krotnie 400 μ l buforu PBS. Następnie, aby utrwalić komórki, dodano 200 μ l świeżo przygotowanego 4 % formaldehydu w PBS i inkubowano przez 30 minut w temperaturze pokojowej. Kolejno, komórki przepłukano 3-krotnie 400 μ l buforu PBS. W celu permeabilizacji błony komórkowej, do komórek dodano 200 μ l Detergent Solution QC i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej i przepłukano 2-krotnie

400 µl buforu PBS. Następnie dodano 200 µl Protease QS w stężeniu 1:4000/dołek w PBS i inkubowano 10 minut w temperaturze pokojowej i przepłukano 3-krotnie 400 µl buforu PBS. Do komórek dodano 200 µl mieszaniny sond i podgrzanego do temperatury 40°C buforu Probe Set Diluent QF w stosunku 1:100, wyszczególnionych w Tabeli 34 i inkubowano przez 3 godziny w 40°C, a następnie przepłukano 3-krotnie 400 µl Wash Buffer, uwzględniając 2-minutowe inkubacje pomiędzy wymianą buforu. Jako kontroli negatywnej użyto sondy wykrywającej bakteryjny transkrypt *Bacillus S. dapB*.

Tabela 34. Spis sond użytych podczas fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ*.

Nazwa sondy	Producent, nr katalogowy	Znacznik detekcji
hsa-mir-1248	Thermo Fisher Scientific, VPNKRM6	Alexa Fluor 488
hsa-mir-1248	Thermo Fisher Scientific, VP7DPJK	Alexa Fluor 647
SNORA81	Thermo Fisher Scientific, VA1-3020052-VC	Alexa Fluor 546
dapB	Thermo Fisher Scientific, VF4-10408	Alexa Fluor 488

Po związaniu się sond z RNA, do komórek dodawano kolejno mieszaniny umożliwiające zwiększenie oraz detekcję sygnału. Po dodaniu każdej z nich, komórki inkubowano 30 minut w 40°C oraz zastosowano serię 3-krotnych płukań 400 µl Wash Buffer pomiędzy dodaniem każdej z mieszanin, uwzględniając 2-minutowe inkubacje pomiędzy wymianą buforu. Komórki wybarwiono DAPI w PBS w stosunku 1:100 przez 1 minutę w temperaturze pokojowej i płukano 400 µl PBS. Po usunięciu silikonowych ścianek z płytek Ibidi, nałożono Prolong® Gold Antifade Reagent (Thermo Fisher Scientific) na każdą próbkę i nakryto szkiełkiem nakrywkowym. Obrazowanie zostało przeprowadzone z użyciem mikroskopu fluorescencyjnego Keyence BZ-X810 z oprogramowaniem BZ-X00E Analyzer.

2.21. Izolacja całkowitego RNA z plazmy krwi pacjentów z GBM

Izolację całkowitego RNA z plazmy krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM przeprowadzono za pomocą roztworu TRI LS Reagent® (Thermo Fisher Scientific). Krew została pozyskana od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM przed operacją i aby zapobiec krzepnięciu przechowywana w EDTA w temperaturze 4°C, a następnie dostarczona do laboratorium w ciągu kilku godzin. W pierwszej kolejności próbki krwi rozcieńczono w PBS w stosunku 1:2 i podzielono na 250 µl porcje. Do każdej próby dodano 750 µl TRI LS Reagent® i inkubowano przez 5 minut w temperaturze pokojowej. Następnie dodano 200 µl chloroformu

i wirowano przy 14 000 RCF w 4°C, a supernatant przeniesiono do nowej probówki o pojemności 1,5 ml. Do każdej z prób dodano ekwiwalentną ilość izopropanolu i inkubowano w temperaturze – 20°C przez noc. Następnego dnia próby wirowano przy 14 000 RCF przez 30 minut w 4°C, supernatant usunięto, a powstały osad przepłukano 1 ml 80 % zimnym etanolem i wirowano przy 14 000 RCF przez 10 minut w 4°C oraz usunięto supernatant. Osad został poddany suszeniu w temperaturze pokojowej, a po wysuszeniu dodano 20 µl sterylnej, podwójnie destylowanej wody. Stężenie wyizolowanego RNA mierzono spektrofotometrycznie przy długości fali λ 260 nm, a jego integralność sprawdzono na żelu agarozowym.

2.22. Izolacja pęcherzyków zewnątrzkomórkowych (EV) z pożywki hodowlanej

W celu oceny obecności zarówno snoRNA jak i sdRNA w EV ulegających sekrecji do pożywki hodowlanej z komórek GBM, zastosowano gotowy zestaw do izolacji exoEasy Maxi Kit (Qiagen). Komórki wysiano w liczbie 5×10^5 /butelkę i 48 godzinach zebrano po 16 ml pożywki hodowlanej z każdej linii oraz przepuszczono przez filtry o wielkości 0,8 µm (Sartorius, 16592). Kolejno dodawano 1 objętość buforu XBP do jednej objętości przefiltrowanej pożywki i wymieszano kilkukrotne obracanie. Pożywkę z buforem XBP nakładano dołączony do zestawu 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 RCF. Ponownie wylewano przesącz, a na kolumnienkę dodawano 500 µl buforu do elucji XE i inkubowano przez 1 minutę, po czym wirowano 5 minut przy 500 RCF. Eluaty pochodzące z tej samej linii komórkowej mieszano ze sobą, po czym dzielono w celu izolacji RNA oraz białka (1/3 eluatu do izolacji RNA i 2/3 eluatu do izolacji białka). W celu izolacji RNA do prób dodawano 500 µl odczynnika TRIzol, natomiast eluat do izolacji białka suszono przez 5 godzin w temperaturze pokojowej z przerwami co godzinę z użyciem koncentratora próżniowego Eppendorf Concentrator plus (Eppendorf) a do osadu dodawano 1 ml Tris-HCl pH 7,5. Poprawność przeprowadzonej izolacji EV potwierdzono przez analizę typu Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała skierowanego przeciwko markerowi EV - CD63.

2.23. Immunoprecypitacja z zastosowaniem „cross-linking”

Komórki GBM hodowano na szalkach o średnicy 150 mm do osiągnięcia minimum 90% konfluencji. Następnie przemyto je buforem PBS, dodano 10 ml zimnego buforu PBS na szalkę i przeniesiono na lód. Kolejno komórki poddano „cross-linkingowi” na lodzie z wykorzystaniem promieniowania UV o długości fali 254 nm i intensywności 0,4 J/cm². Po tej procedurze, bufor PBS usuwano, a do komórek dodano 1 ml buforu RIP, którego skład znajduje się w Tabeli 35, przeniesiono do probówek typu eppendorf i inkubowano 20 minut na lodzie. Tak przygotowaną mieszaninę komórek przepuszczono 7 razy przez igłę o rozmiarze 21G za pomocą strzykawki o pojemności 2 ml i wirowano przez 10 minut w 13 000 RPM w 4°C. Po wirowaniu supernatant przeniesiono do nowej probówki typu eppendorf a osad wyrzucono. Kolejno, przy pomocy metody BCA (Thermo Fisher Scientific) oceniono stężenie białka. Następnie w probówce typu eppendorf o pojemności 2 ml wymieszano 1 mg białka wraz z 1 µg przeciwciała na wybrane białko (FUS, DROSHA lub AGO2) lub przeciwciała przeciwko IgG. Dodatkowo w osobnej probówce przygotowano również „input” stanowiący 10 % objętości użytego białka. Kolejno próby inkubowano na rotorze w 4°C. Czas inkubacji uzależniony był od białka: w przypadku białek FUS i AGO2 inkubacja trwała 2 godziny, natomiast dla białka DROSHA całą noc. Kolejno przygotowano 30 µl kulek magnetycznych opłaszczonych białkiem G (Dynabeads, Protein G, Thermo Fisher Scientific, 10004D) na próbę przemywając je dwukrotnie ekwiwalentną objętością buforu RIP i na koniec rozpuszczając je w 30 µl buforu RIP. Tak przygotowane kulki magnetyczne dodano przygotowanych wcześniej prób i inkubowano na rotorze w 4°C przez 1 godzinę. Po inkubacji oddzielono supernatant z użyciem separatora magnetycznego i usunięto go. Kulki magnetyczne ze związanymi kompleksami białko-RNA przemyto trzykrotnie 800 µl „Wash Buffer”, a następnie trzykrotnie 800 µl „High-salt Wash Buffer”, których składy podano w Tabeli 36 i Tabeli 37. Podczas każdego płukania próby mieszano na rotorze przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. W ostatnim kroku próby przemyto buforem RIP również mieszając na rotorze przez 2 minuty w temperaturze pokojowej. Następnie każdą próbę rozpuszczono w 60 µl buforu RIP. 1/3 objętości została wykorzystana w celu wykonania analizy Western Blot, a 2/3 objętości do izolacji RNA. Do prób przeznaczonych do wykonania metody Western Blot dodano 5 µl buforu obciążającego (EURx) i zamrożono w -20°C. Kulki magnetyczne oddzielono przy pomocy separatora magnetycznego, a supernatant nałożono na żel poliakrylamidowy. Jako przeciwciała drugorzędowego użyto przeciwciała Veriblot (Abcam, AB131366). Do prób przeznaczonych do izolacji RNA dodano 5 µl proteiny K i dopełniono buforem do proteiny K (skład buforu

zamieszczony w Tabeli 38) do objętości 100 μ l. Następnie inkubowano przez 1 godzinę w 70°C z wytrząsaniem przy 300 RPM. Kolejno do każdej z prób dodano 700 μ l TRIzolu i zamrożono w -80°C. Następnego dnia przeprowadzono izolację RNA według opisanego w niniejszej pracy protokołu z całkowitą inkubacją -80°C po dodaniu izopropanolu.

Tabela 35. Skład buforu RIP.

Bufor RIP	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 8.0	20 mM
NaCl	100 mM
EDTA	0,5 mM
NP40	0,5%
SDS	0,1%

Tabela 36. Skład buforu „Wash Buffer”.

Bufor “Wash Buffer”	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	100 mM
MgCl ₂	1 mM
NP40	0,05%

Tabela 37. Skład buforu „High Salt Wash Buffer”.

Bufor “High Salt Wash Buffer”	
Składnik	Stężenie końcowe
Tris pH 7,4	50 mM
NaCl	500 mM
MgCl ₂	1 mM
NP40	0,05%

Tabela 38. Skład buforu do proteiny K.

Bufor do proteiny K	
Składnik	Stężenie końcowe
NaCl	100 mM
Tris pH 7,4	10 mM
SDS	0,5%
EDTA	1 mM

2.24. Analizy *in silico*

Do wygenerowania struktur drugorzędowych snoRNA wykorzystano narzędzie RNAfold WebServer (<http://rna.tbi.univie.ac.at/cgi-bin/RNAWebSuite/RNAfold.cgi>). Działanie programu opiera się na przewidywaniu struktur przy użyciu algorytmu minimalnej swobodnej energii (MFE, ang. *Minimum Free Energy*), co skutkuje generowaniem struktur charakteryzujących się największą stabilnością. Analizy dotyczące białek wiążących snoRNA zostały wykonane z użyciem narzędzia POSTAR3 wykorzystującego bazę danych CLIPdb, zawierającą dane z sekwencjonowania RNA po zastosowaniu immunoprecypitacji z „cross-linking” na poszczególne białka [272]. Sieć interakcji białko-białko została wygenerowana przy pomocy narzędzia STRING w wersji 12.0 (<http://string-db.org>). Analizy ekspresji transkryptów wybranych białek zostały wykonane z wykorzystaniem serwera GEPIA2 [273]. Serwer ten korzysta z danych sekwencjonowania RNA z projektu TCGA. Analiza procentowa udziału różnych regionów i rodzajów RNA w wiązaniu z wybranymi białkami została wykonana korzystając z danych dostępnych w bazie danych EuRBPDB (<http://eurpdb.gzsys.org.cn/>).

2.25. Różnicowa analiza poziomu sdRNA i snoRNA w EV wyizolowanych z plazmy krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM

W celu identyfikacji sdRNA oraz snoRNA występujących w EV obecnych w plazmie krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, wykorzystano dane pochodzące z sekwencjonowania RNA zaczerpnięte z repozytorium NCBI Gene Expression Omnibus (GEO) (numer dostępu GEO: GSE122488). Sekwencjonowanie RNA zostało wykonane z użyciem platformy Illumina HiSeq 2000 w technologii pojedynczych odczytów (ang. *single-end reads*). Sekwencjonowaniu RNA zostało poddane RNA wyizolowane z EV pozyskanych z plazmy krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (n = 12) oraz RNA z plazmy zdrowych osób z grupy

kontrolnej dobranych pod względem wieku i płci (n = 16). EV zostały wyizolowane z użyciem metody chromatografii wykluczania zależnej od wielkości cząsteczek (SEC, ang. *Size Exclusion Chromatography*) [169].

Analiza bioinformatyczna została przeprowadzona przez dr. Marcina Sajka (RNA Bioscience Initiative, University of Colorado School of Medicine, Aurora, USA). Surowe odczyty jako pliki fastq zostały pobrane z repozytorium GEO przy pomocy pakietu SRA-Toolkit w wersji 3.03 (<https://github.com/ncbi/sra-tools>). Kontrolę jakości surowych odczytów sekwencjonowania przeprowadzono za pomocą narzędzia FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>) w wersji 0.12.1. Sekwencje adapterów zostały zidentyfikowane za pomocą programu FindAdapt [274], a następnie usunięte przy użyciu narzędzia Cutadapt [275] w wersji 4.4 używając następujących ustawień: -a SEKWENCJA_ADAPTERA -m 15 -j 0 --trim-n. Następnie przeprowadzono drugą kontrolę jakości za pomocą narzędzia FastQC. Kolejno, pliki *.fastq zostały przekonwertowane do formatu FASTA przy pomocy narzędzia Seqtk seq z pakietu Seqtk (<https://github.com/lh3/seqtk>) w wersji 1.4. Do dalszych analiz pozostawiono tylko unikalne odczyty, usuwając kopie wynikające z reakcji PCR przy użyciu narzędzia fastx_collapser z pakietu FASTX-Toolkit (http://hannonlab.cshl.edu/fastx_toolkit/) w wersji 0.0.14. Odczyty zmapowano do ludzkiego transkryptomu GRCh38 pobranego z Gencode v.45 z użyciem narzędzia Bowtie 2 [276] w wersji 2.2.5, a poziom poszczególnych transkryptów oceniono przy użyciu narzędzia Salmon [277] w wersji 1.6.0. Dla obydwu narzędzi (Bowtie 2 i Salmon) użyto parametrów wcześniej opisanych jako optymalne dla oceny poziomu krótkich RNA [278]. Różnicowa analiza ekspresji (DGE, ang. *Differential Gene Expression*) została wykonana z wykorzystaniem biblioteki DESeq2 [279] w wersji 1.34.0. W celu znalezienia cząsteczek miRNA pochodzących ze snoRNA plik *.gtf pobrany z Gencode v.45 zawierający koordynaty genów i transkryptów dla genomu GRCh38 wczytano do R za pomocą biblioteki rtracklayer [280] w wersji 1.54.0, a następnie wyszukano nakładające się koordynaty snoRNA i miRNA przy pomocy biblioteki valr [281] w wersji 0.6.6. Wizualizację analizy wykonano przy pomocy bibliotek ggpubr (<https://rpkgs.datanovia.com/ggpubr/>) w wersji 0.4.0 i pheatmap (<https://github.com/raivokolde/pheatmap>) w wersji 1.0.12.

2.26. Analiza statystyczna wyników

Analiza statystyczna wyników została przeprowadzona z wykorzystaniem oprogramowania GraphPad Prism 9 (GraphPad Software). Wszystkie eksperymenty zostały wykonane w 3 powtórzeniach biologicznych, a wyniki przedstawione jako wartości średnie \pm SD. Różnice między wartościami średnich prób badanych a kontrolą zostały porównane z zastosowaniem analizy wariancji ANOVA. W przypadku wyników dotyczących poziomu wybranych cząsteczek na tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, istotność statystyczna została obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych, a wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM. Za statystycznie istotne przyjęto wyniki na poziomie: * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; brak istotności statystycznej dla $p \geq 0,05$.

3. Cel pracy

Głównym celem pracy doktorskiej była identyfikacja i charakterystyka nowej klasy regulatorowych RNA – sdRNA wraz z ich prekursorowymi snoRNA, a także określenie ich roli w rozwoju i progresji GBM. Ważnymi elementami badań była również ocena ich potencjału prognostycznego oraz diagnostycznego, jak i potencjalnych mechanizmów powstawania sdRNA. Cel pracy został zrealizowany w oparciu o następujące hipotezy oraz cele badawcze:

- 1. Identyfikacja i ocena poziomu sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w glejaku wielopostaciowym.** Na podstawie uzyskanych wyników sekwencjonowania RNA, wybrano cząsteczki sdRNA o najwyższej liczbie odczytów w GBM. Walidacja wybranych cząsteczek pozwoliła na porównanie ich poziomu między GBM a kontrolą zdrowego mózgu, a także poziomu ich prekursorowych snoRNA, co umożliwiło wybór kandydatów potencjalnie zaangażowanych w rozwój tego nowotworu.
- 2. Ocena potencjału prognostycznego i diagnostycznego wybranych sdRNA oraz snoRNA w glejaku wielopostaciowym.** W celu oceny potencjału prognostycznego wybranych cząsteczek, zweryfikowano ich obecność w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych z medium hodowlanego, a także plazmie pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. W poszukiwaniu biomarkerów GBM, ocenie poddano ich poziom w podtypach GBM, a także w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV) w plazmie pacjentów z GBM i zdrowych osób.
- 3. Ogólna charakterystyka i badanie potencjalnych funkcji wybranych sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA.** Realizacja tego celu obejmowała ocenę tkankowo- i subkomórkowo-zależnej specyficzności występowania wybranych cząsteczek. Aby określić ich udział w procesie nowotworzenia, określono ich poziom w warunkach hipoksji i frakcji komórek macierzystych GBM oraz interakcje z wybranymi białkami.
- 4. Badanie mechanizmów powstawania sdRNA.** W celu identyfikacji białek zaangażowanych w mechanizm przetwarzania snoRNA do sdRNA, wygenerowano struktury drugorzędowe snoRNA i określono lokalizację obecnych w nich sekwencji sdRNA. Analizy oparte o zmiany poziomu białka FUS, a także immunoprecypitacji wybranych białek, pozwoliły określić ich potencjalny udział w powstawaniu sdRNA.

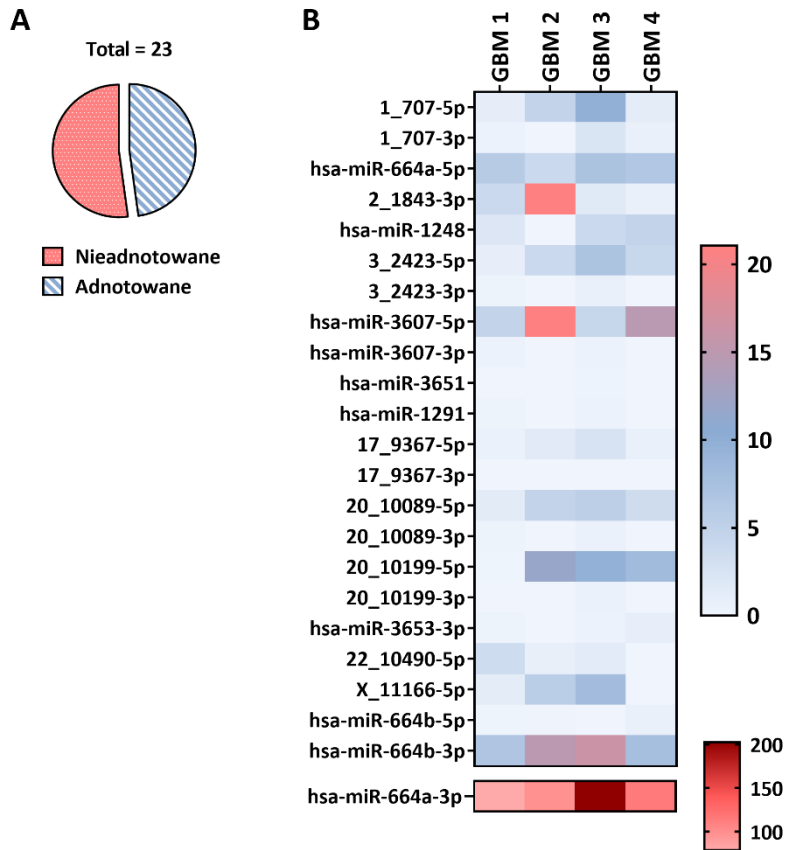
Założone cele zostały osiągnięte, a uzyskane wyniki zostały przedstawione w niniejszej rozprawie doktorskiej.

4. Wyniki

4.1. Ocena poziomu cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorów snoRNA w GBM

4.1.1. Analiza wyników sekwencjonowania RNA

Na podstawie wyników sekwencjonowania wykonanego w Zakładzie Neuronkologii Molekularnej ICHB PAN pozyskano dane dotyczące liczby odczytów dla cząsteczek sdRNA wraz z ich pochodzeniem. Sekwencjonowanie zostało przeprowadzone z wykorzystaniem tkanek pacjentów ze zdiagnozowanym GBM w celu oceny transkryptomu krótkich ncRNA w GBM [269]. Wyniki przeprowadzonego sekwencjonowania RNA pozwoliły na identyfikację 23 cząsteczek sdRNA. Ponad 50 % zidentyfikowanych cząsteczek to nieadnotowane wcześniej w bazach danych cząsteczki, pozostałe natomiast to znane cząsteczki miRNA mogące pochodzić z cząsteczek snoRNA (Ryc. 4 A). Dla zidentyfikowanych cząsteczek sdRNA odnotowano zróżnicowaną liczbę odczytów na milion (RPM, ang. *Reads Per Million*). Największą ich liczbę sumarycznie we wszystkich badanych próbach odnotowano dla cząsteczek hsa-miR-664a-3p (suma = 493,99), hsa-miR-664b-3p (suma = 45,34) oraz hsa-miR-3607-5p (suma = 44,68), najmniejszą natomiast dla cząsteczek 3_2423-3p, hsa-miR-664b-5p, hsa-miR-3607-3p, 20_10089-3p, hsa-miR-1291, 20_10199-3p, hsa-miR-3651 oraz 17_9367-3p (suma < 1) (Ryc. 4 B). Wszystkie zidentyfikowane cząsteczki sdRNA z sumaryczną liczbą RPM we wszystkich poddanych sekwencjonowaniu tkankach GBM wraz z ich potencjalnymi prekursorowymi snoRNA zostały zamieszczone w Tabeli 39. Długość zidentyfikowanych cząsteczek sdRNA wynosi pomiędzy 19 (dla cząsteczki 1_707-3p) a 26 (dla cząsteczki hsa-miR-1248) nukleotydów, natomiast w przypadku snoRNA pomiędzy 63 (dla cząsteczki SNORD138) do 266 (dla cząsteczki SCARNA6) nukleotydów. Z większości cząsteczek snoRNA (70 %): SNORA36B, SNORA36A, SNORD138, SNORA60, SNORA77, SNORA63, SNORA51, SNORD125, SNORA38B powstają dwie cząsteczki pochodne sdRNA. Większość snoRNA (75 %) należy do klasy H/ACA z wyjątkiem tych należących do klasy C/D: SNORA138 i SNORA125 czy cząsteczki SCARNA6 zlokalizowanej w ciałkach Cajala (Tab. 39).



Rycina 4. Cząsteczki sdRNA zidentyfikowane w GBM. A. Rozkład danych nieadnotowanych oraz adnotowanych wcześniej zidentyfikowanych sdRNA. **B.** Heatmapa przedstawiająca liczbę odczytów na milion (RPM) zidentyfikowanych cząsteczek sdRNA.

Tabela 39. Cząsteczki sdRNA zidentyfikowane w GBM wraz z ich prekursorowymi cząsteczkami snoRNA. Tabela zawiera sumaryczną liczbę odczytów na milion (RPM) sdRNA uzyskanych podczas sekwencjonowania wraz z wytypowanymi dla nich potencjalnymi prekursorowymi cząsteczkami snoRNA. W tabeli przedstawiono również długości cząsteczek sdRNA i snoRNA, klasy, do jakich należą snoRNA oraz sekwencje nukleotydowe snoRNA wraz z zaznaczonymi na niebiesko sekwencjami nukleotydowymi sdRNA.

Suma RPM	Nazwa sdRNA	Długość sdRNA	Nazwa snoRNA	Długość snoRNA	Klasa snoRNA	Sekwencja snoRNA (5' → 3') sekwencja sdRNA zaznaczona na niebiesko
493,99	hsa-miR-664a-3p	22	SNORA36B	131	H/ACA	UCCAAAGUGUUAAGUUCAGUUCAGGGUAGCUUCCCU GCUCUGUUAUUAAACUUUGGAACAUUGAAACUGGC UAGGGAAAUGAUUGGAUAGAAACUUAUUUCU UAUU CAUUUAUCCCCAGCCUACAAAA
23,32	hsa-miR-664a-5p	23	SNORA36B	131	H/ACA	UCCAAAGUGUUAAGUUCAGUUCAGGGUAGCUUCCCU GCUCUGUUAUUAAACUUUGGAACAUUGAA ACUGGC UAGGGAAAUGAUUGGAU UAGAAACUUAUUUCU UAUU CAUUUAUCCCCAGCCUACAAAA
45,34	hsa-miR-664b-3p	21	SNORA36A	131	H/ACA	UCCAAAGUGUUGAGUUCAGUCCAGGGCAGCUUCCCU GUUCUGUUAUUAAACUUUGGGACAUUAAAUGGGC UAAGGGGAGAUUGGGUAGAAAGUAUUUUCU UAUU CAUUUGCCUCCCAGCCUACAAAA
0,84	hsa-miR-664b-5p	23	SNORA36A	131	H/ACA	UCCAAAGUGUUGAGUUCAGUCCAGGGCAGCUUCCCU UUCUGUUAUUAAACUUUGGGACAUUAAA UGGGCU AAGGGGAGAUUGGGU AGAAAGUAUUUUCU UAUU AUUUGCCUCCCAGCCUACAAAA
44,68	hsa-mir-3607-5p	21	SNORD138	63	C/D	GUGCAUGUGAUGAAGCAAUCAGU AUGAAUGAAUUC AUGAUACUGUAAACGCUUUCUGAUGUA
0,74	hsa-miR-3607-3p	19	SNORD138	63	C/D	GUGCAUGUGAUGAAGCAAUCAGUAUGAAUGAAUUC AUGAU ACUGUAAACGCUUUCUGAUGUA
29,65	20_10199-5p	21	SNORA60	136	H/ACA	CCUGCAUUCAAAAUGAUCACGGGCUGCCUGUGCUCU GGUCAUCAAUACGCAGGGAGAGGAAUUG CUGAAAG CCGUUCCCCGUGUUU GGAGGGUUCACACCUGUCCCU UUCAAAUGCUGGCGCUUUCACACACUC

0,47	20_10199-3p	21	SNORA60	136	H/ACA	CCUGCAUUCAAAAUGAUCACGGGCUGCCUGUGCUCU GGUCAUCAUAACGCAGGGAGAGGAAUUGCUGAAAG CCGUUCCCGUGUUUGGAGGGUUCACACCUGCCUU UCAAA UGCUGGCGCUUCACACACUC
27,15	2_1843-3p	19	SCARNA6	266	Cialka Cajala	GGUCAUGAUGAAUGGUAAAAGGUCUGAGUCCUCAG AUCCCCUCCGGCAUCCAGUUAUCCCC CAGCUGCCUC UCCUCCAUCGCACUUCAGAAGUGCUGCGAUGGGCAG AAGGGCAGCUGACACUCCGUGAUGUCCCUCAUUCUGU GUUCCUCCGUGAGCUCAGGGAAGACACUGGUUGGCAU CCAACAGCUUAGUCACAAAGGGAUUUGAUUGUUGGG AGUGCUGGUUUCUGUGGCUAUGAUCUGCCUUGUCAA GCUGAGACCU
16,63	1_707-5p	20	SNORA77	125	H/ACA	GCAGACUCACUAUGCACCUG ACUGUACUUCAGGCA GGUGCUUUUUCUGUCUGCCAGAGAAACAUCCAGGGU GCUGUGGCUGCCUACCUAUCCAGGGCGAUGCAGCUC CCUGGGGACACAGGU
3,20	1_707-3p	16	SNORA77	125	H/ACA	GCAGACUCACUAUGCACCUGACUGUACUUCAGGCGAG GUGCUUUUUCUGUCUGCCAGAGAAACAUCCAGGGU GCUGUGGCUGCCUC ACCUAUCCAGGGCGAUGCAGCU CCUGGGGACACAGGU
15,83	3_2423-5p	22	SNORA63	135	H/ACA	AAAGCAGGAUUCAGACUACAAUUA AGCUGCUAAGUG CUGUGUUGUCGUUCCCCUGCUUAAAAUAAAGUUGUU UCUUAACUAUACCUGUCUGCUAUUCUCCUGUAGCAGC CAGGGACGCUUGGUCUCAUACAUGU
0,85	3_2423-3p	19	SNORA63	135	H/ACA	AAAGCAGGAUUCAGACUACAAUUAAGCUGCUAAGUGC UGUGU UGUCGUUCCCCUGCUUAAA UAAAGUUGUU UCUUAACUAUACCUGUCUGCUAUUCUCCUGUAGCAGC CAGGGACGCUUGGUCUCAUACAUGU
14,88	20_10089-5p	20	SNORA51	132	H/ACA	GGCCUCCUGGUCUUAACCACAGGCUGUGUUCUACAC UGACUGUAUAGAAAGAGGAGGUAGAGUAAACCU ACC CCAUAUACACCUCAGCUC AGGCCUGUGCCUGGUCU GUAUUGUGAAUGGGGAACAUAAG

0,73	20_10089-3p	19	SNORA51	132	H/ACA	GCCUCCUGGUGCUUACCACAGGCUGUGUUCUACACU GACUGUAUAGAAAGAGGAGGUAGAGUAAACCUACCCC AUUAACACCUCAGCUCAGGCCUGUGCCUGGUCUGUA UUGUGAAUGGGGGAACAUAAG
14,61	X.111.66	20	SNORA11	131	H/ACA	GGGGUGUGCUCAGAGCAGGGGGCCCAAAGAAUG GCUCCUCUGUUUACAACACACCCCAACAGGAAUC UGGGGUCAUUGUGAUGAGGGCGUCAAAACUUGUG GCUUCCCUAUGAACAAACGUCCCCAACACCU
10,62	hsa-mir-1248	26	SNORA81	178	H/ACA	ACCUUCUUGUAUAAGCACUGUGCUAAAAUUGCAGAC ACUAGGACCAUGUCUUGGUUUUUGCAAUAUUGCUUGC AGAGUACACACAAGAAGAAAAGUAACAGCACUAGAU UGUAAAAGACUGGGGUGGACCUCUUCUUAUUGUCCAA UGUCCUUGUCUUAAGAUUUGGUGCAAUAUCU
5,67	hsa-miR-3653-5p	20	SNORD125	96	C/D	ACCCUGGCAGCCCCUCCUGAUGAUUCUUCUCCUG AGCACGCUCAUGAUGAGCAAACUGAGCCUCUAGAAG UUGACUGAAGGGGCUGCUUCCCC
1,49	hsa-miR-3653-3p	18	SNORD125	96	C/D	ACCCUGGCAGCCCCUCCUGAUGAUUCUUCUCCUGA GCACGCUCAUGAUGAGCAAACUGAGCCUCUAGAAG UUGACUGAAGGGGCUGCUUCCCC
5,25	17_9367-5p	20	SNORA38B	130	H/ACA	CCUCCUACAAAGGCAUGUCU AUAGUUCUUGUCUUU GGACAUGUAAGAAUUGGAGGCAAAGAAAUGUGGACU UGGAGAAAUCUGGGGCCAGCUUGCUCUCCGCAGGCUC AAGAUAACCAUCCCAUAUAG
0,14	17_9367-3p	20	SNORA38B	130	H/ACA	CCUCCUACAAAGGCAUGUCUAGUUCUUGUCUUUG GACAUGUAAGAAUUGGAGGCAA AGAAAUGUGGACUU GGAGAAAUCUGGGGCCAGCUUGCUCUCCGCAGGCUCA AGAUAACCAUCCCAUAUAG
0,61	hsa-miR-1291	23	SNORA34	136	H/ACA	GUGGCCUGACUGAAGACCAGCAGU UGUACUGUGGC UGUUGGUUUCUAGCAGAGGCCUAAAGGACUGUCUCC UGUGGUCUGUUGGCUUCUGGGACCUCAGUAGGGA AUGGCUAUUUCAUUUGGAAGAAACAAC
0,23	hsa-miR-3651	23	SNORA84	132	H/ACA	GCCUGUGGUUGCUGGAUGCUGUUGUGCAUGGACAGC UCUCCAGUGGAUUCGAUGGGCCAUAGCAAUCCUGUGA UUUAUGCAUGGAGGCUGCUUCUCCUCAGCAGCUGCCA UAGCCCGGUCGUGUACAUG

4.1.2. Walidacja wybranych cząsteczek sdRNA oraz ich prekursorów snoRNA w tkankach GBM

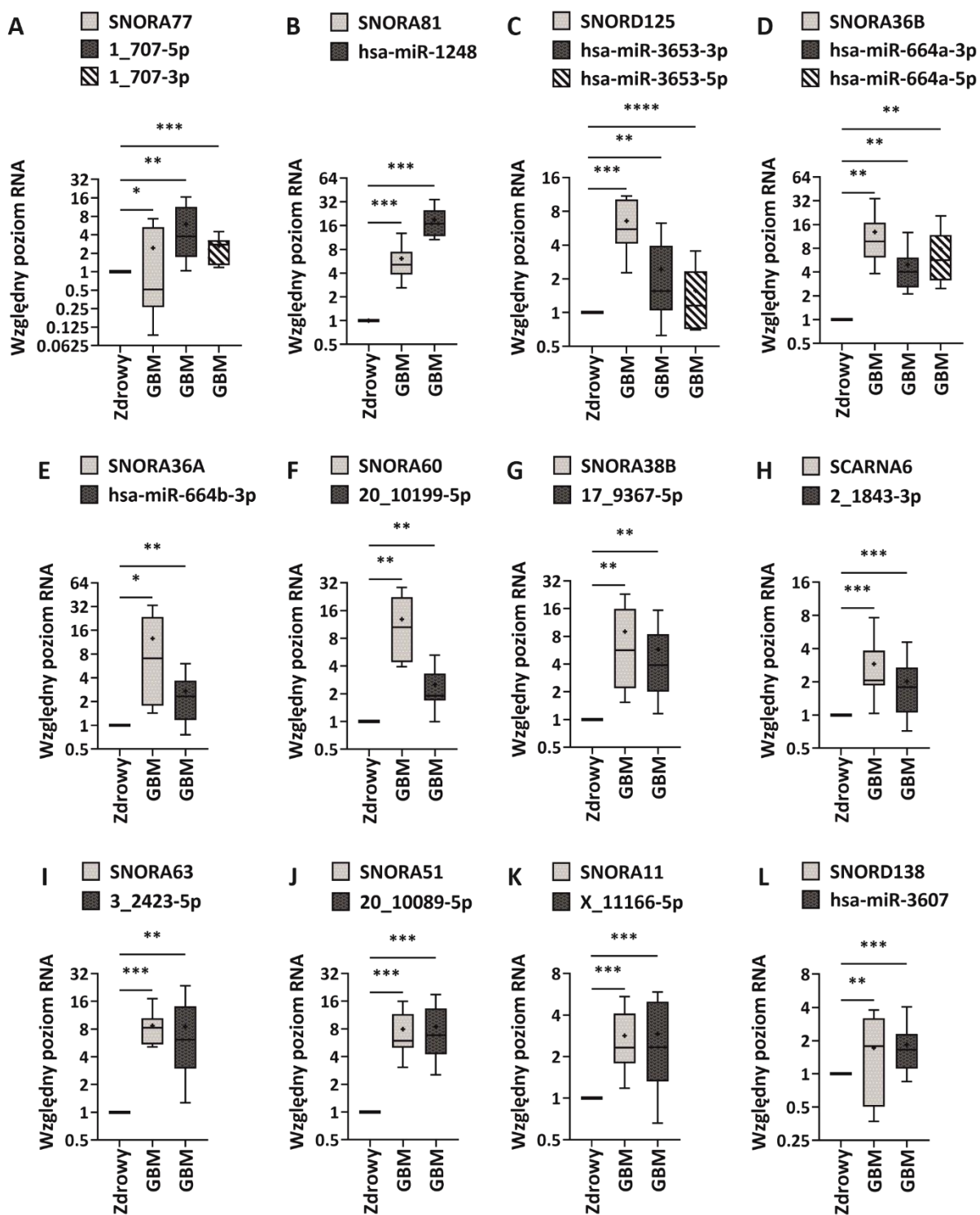
Przeprowadzone sekwencjonowanie RNA umożliwiło identyfikację cząsteczek sdRNA o zmienionym poziomie w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. W celu identyfikacji sdRNA potencjalnie zaangażowanych w rozwój GBM, walidacji poddano 15 cząsteczek sdRNA, dla których odnotowano sumaryczną wartość RPM > 1 wraz z ich prekursorowymi cząsteczkami snoRNA. Walidacja została przeprowadzona za pomocą metody RT-qPCR z wykorzystaniem 12 tkanek pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Jako kontroli użyto komercyjnie dostępnego RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Wszystkie poddane walidacji cząsteczki sdRNA jak i snoRNA, za wyjątkiem SNORA77, wykazują podwyższony poziom w porównaniu do kontroli zdrowego mózgu. Wśród nich możemy wyróżnić 3 grupy:

- 1) cząsteczki sdRNA wykazujące podwyższony poziom w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu jak i prekursorów snoRNA (20 %); (Ryc. 5 A-B)
- 2) cząsteczki sdRNA wykazujące podwyższony poziom w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu ale niższy w porównaniu do prekursorów snoRNA (54 %); (Ryc. 5 C-H)
- 3) cząsteczki sdRNA wykazujące podwyższony poziom w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu i podobny poziom w porównaniu do prekursorów snoRNA (26 %); (Ryc. 5 I-L).

W grupie pierwszej możemy wyróżnić cząsteczkę sdRNA 1.707-5p, której poziom w tkankach GBM jest niemal 6-krotnie wyższy niż w zdrowym mózgu i jednocześnie prawie 2,5-krotnie wyższy w porównaniu do jej prekursorowej SNORA77. Kolejną cząsteczką powstającą ze SNORA77 jest 1_707-3p, którą cechuje ponad 2,5-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM niż w zdrowym mózgu. SNORA77 jako jedyna z badanych cząsteczek wykazuje niższy poziom w GBM aniżeli w zdrowym mózgu (Ryc. 5 A). W przypadku cząsteczki hsa-miR-1248 obserwujemy prawie 19-krotny wzrost jej poziomu w tkankach GBM w porównaniu do kontroli, przy 3-krotnie niższej wartości poziomu dla jej prekursora SNORA81. Jednocześnie, cząsteczka hsa-miR-1248 wykazuje najwyższy poziom w porównaniu do zdrowego mózgu w stosunku do wszystkich walidowanych cząsteczek, zarówno sdRNA jak i snoRNA (Ryc. 5 B).

Dla ponad 50 % cząsteczek sdRNA obserwujemy podwyższony poziom w GBM w porównaniu do zdrowego mózgu, ale niższy w porównaniu do prekursorów snoRNA. Cząsteczki sdRNA pochodzące z prekursorowego SNORD125 wykazują ponad 1,5-krotny wzrost poziomu w porównaniu do zdrowego mózgu przy jednoczesnym prawie 3-krotnie niższym dla cząsteczki hsa-miR-3653-3p i ponad 4-krotnie niższym dla cząsteczki hsa-miR-3653-5p poziomie w porównaniu do SNORD125 (Ryc. 5 C). SdRNA hsa-miR-664a-3p oraz hsa-miR-664a-5p pochodzące ze SNORA36B wykazują ponad 5-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM aniżeli w zdrowym mózgu i jednocześnie ponad 2,5-krotnie niższy oraz 1,5-krotnie niższy poziom dla kolejno hsa-miR-664a-3p i hsa-miR-664a-5p w porównaniu z SNORA36B (Ryc. 5 D). W przypadku cząsteczki hsa-miR-664b-3p pochodzącej ze SNORA36A obserwujemy jej prawie 3-krotny wzrost względem zdrowego mózgu, z jednoczesnym ponad 4,5-krotnie wyższym poziomem jej prekursora SNORA36A (Ryc. 5 E). Podobnie jest w przypadku cząsteczki 20_10199-5p pochodzącej ze SNORA60, której poziom jest 2,5-krotnie wyższy aniżeli w kontroli i jednocześnie ponad 5-krotnie niższy niż SNORA60 (Ryc. 5 F). Ponadto, SNORA36B, SNORA36A, jak i SNORA60 wykazują najwyższy poziom wśród walidowanych snoRNA, który jest ponad 12-krotnie wyższy w tkankach GBM niż w zdrowym mózgu (Ryc. 5 D-F). SdRNA 17_9367-5p wykazuje prawie 6-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM w odniesieniu do kontroli (Ryc. 5 G), natomiast sdRNA 2_1843-3p ponad 2-krotnie wyższy (Ryc. 5 H). Poziom obydwu tych cząsteczek jest 1,5-krotnie niższy niż ich prekursorów, kolejno SNORA38B i SCARNA6 (Ryc. 5 G-H).

W ostatniej grupie wszystkie sdRNA posiadają zbliżony poziom w porównaniu do zdrowego mózgu w odniesieniu do swoich prekursorów. W tej grupie cząsteczek, najwyższym poziomem w tkankach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu charakteryzują się sdRNA 3_2423-5p (Ryc. 2 I) oraz 20_10089-5p (Ryc. 2 J). Cząsteczkę sdRNA X_11166-5p cechuje prawie 3-krotnie wyższy poziom w tkankach GBM niż w zdrowym mózgu (Ryc. 2 K), a hsa-miR-3607 prawie 2-krotnie wyższy poziom (Ryc. 2 L).



Rycina 5. Względny poziom wybranych snoRNA i sRNA w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (A-L). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Na wykresie, linia na kolumnie reprezentuje medianę, natomiast znak „+” średnią wartość. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych: ns – nieistotnie statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

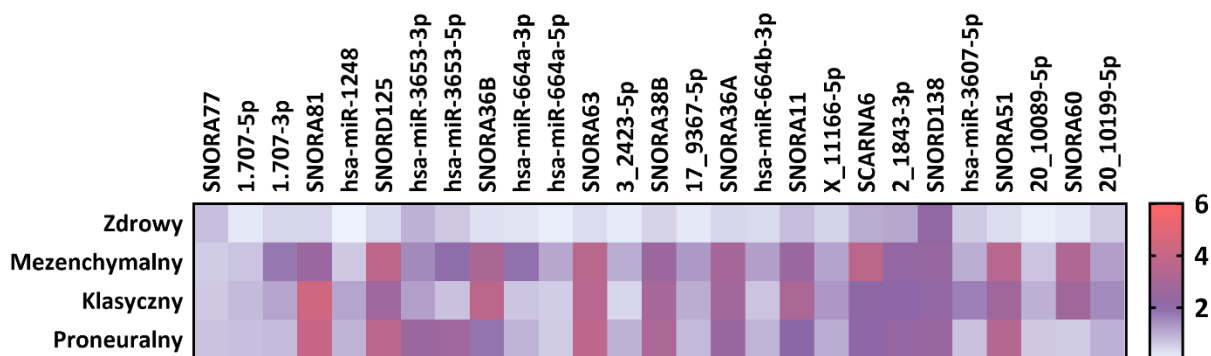
4.2. Potencjał diagnostyczny wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA

4.2.1. Ocena poziomu wybranych sdRNA oraz snoRNA w podtypach GBM

Według najnowszej klasyfikacji Verhaak'a z 2017 roku, wyróżniamy 3 podtypy GBM: proneuralny, klasyczny i mezenchymalny, z czego podtyp mezenchymalny charakteryzuje się największą agresywnością, a klasyczny najlepszą odpowiedzią pacjentów na leczenie [65, 66]. Wykonane w Zakładzie Neuroonkologii Molekularnej sekwencjonowanie RNA tkanek pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM (n = 26) umożliwiło ich stratyfikację na wymienione wyżej 3 podtypy molekularne GBM. Większość tkanek GBM (9/12) wykorzystanych w niniejszej pracy pokryła się z tkankami poddanymi sekwencjonowaniu, co pozwoliło na ocenę poziomu zarówno sdRNA, jak i snoRNA w podtypach molekularnych GBM.

Poziom wszystkich badanych sdRNA, jak i snoRNA nie różnił się znacznie między podtypami molekularnymi GBM. Dla cząsteczki 1_707-3p, najwyższy poziom odnotowano w podtypie mezenchymalnym, charakteryzującym się najwyższą agresywnością (średnia = 1,77), a najniższy w podtypie proneuralnym o najniższej agresywności. W podtypie mezenchymalnym wysoki poziom odnotowano dla sdRNA hsa-miR-664a-3p (średnia = 1,87), a w podtypie proneuralnym wysoki poziom zaobserwowano dla cząsteczek hsa-miR-3653-3p i hsa-miR-3653-5p. Cząsteczka 2_1843-3p natomiast wykazuje wysoki poziom we wszystkich podtypach.

Odnosnie prekursorowych cząsteczek snoRNA, prawie wszystkie cząsteczki za wyjątkiem SNORA77 oraz SNORA60 w podtypie proneuralnym, wykazywały wysoki poziom we wszystkich podtypach. Najwyższe wartości odnotowano dla cząsteczki SNORA81 w podtypie klasycznym (średnia = 4,39) i proneuralnym (średnia = 4,02). W podtypie mezenchymalnym natomiast najwyższy poziom zaobserwowano dla cząsteczki SCARNA6, a jej najniższy poziom w podtypie proneuralnym. Dla cząsteczek SNORA77 i SNORD138 zaobserwowano podobny poziom we wszystkich podtypach (Ryc. 6).



Rycina 6. Heatmapa przedstawiająca poziom wybranych sRNA oraz snoRNA w podtypach GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM o istotności statystycznej $p < 0,05$ i znormalizowano względem genów referencyjnych.

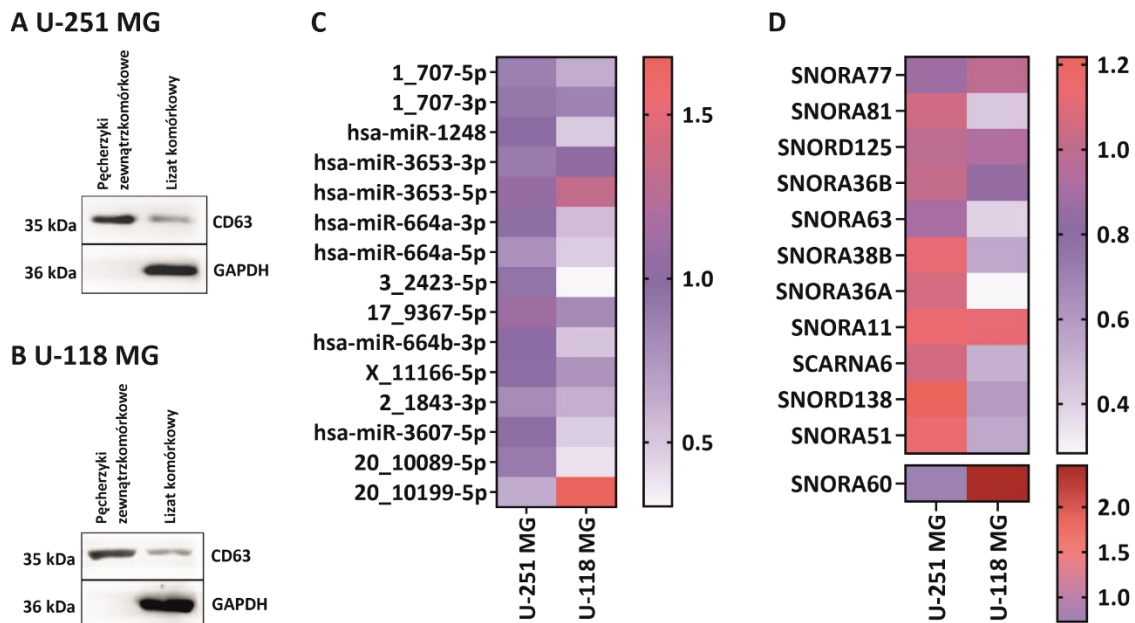
4.2.2. Analiza poziomu wybranych sRNA i snoRNA w EV

EV odgrywają kluczową rolę w rozwoju i progresji GBM poprzez przenoszenie obecnych w nich cząsteczek do sąsiednich komórek lub płynów pozakomórkowych. Wśród tych cząsteczek, prócz białek, wyróżniamy również ncRNA, które opisane zostały jako potencjalne biomarkery diagnostyczne, jak i prognostyczne w GBM [119, 120, 172, 173, 282].

W celu oceny udziału badanych w niniejszej pracy cząsteczek sRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w rozwoju i progresji GBM, sprawdzono, czy cząsteczki te mogą być sekwestrowane poza komórkę i są obecne w EV. Przy użyciu gotowego zestawu odczynników, przeprowadzono izolację EV z medium hodowlanego linii komórkowych U-251 MG oraz U-118 MG. W celu potwierdzenia poprawności wykonanej izolacji, wykonano analizę Western Blot z użyciem przeciwciała specyficznego dla białka CD63 będącego markerem EV. Eksperyment potwierdził obecność tego białka we frakcji EV zarówno w linii komórkowej U-251 MG (Ryc. 7 A), jak i U-118 MG (Ryc. 7 B).

Następnie ocenie poddano poziom wszystkich badanych sRNA oraz snoRNA w wyizolowanej frakcji. W przypadku cząsteczek sRNA najwyższy poziom odnotowano dla cząsteczek 20_10199-5p (średnia = 1,68) oraz hsa-miR-3653-5p (średnia = 1,33) i hsa-miR-3653-3p (średnia = 1,03) w linii komórkowej U-118 MG. Dla wszystkich cząsteczek sRNA z wyjątkiem wymienionych powyżej oraz cząsteczki 1_707-3p zaobserwowano wyższy poziom w EV w linii komórkowej U-251 MG. W tej linii najwyższy poziom wykazano dla cząsteczki 17_9367-5p (średnia = 1,1). Pozostałe cząsteczki wykazywały zbliżony poziom (średnia pomiędzy 0,62 dla 20_10199-5p a 1,06 dla hsa-miR-3653-5p) (Ryc. 7 C).

Najwyższy ze wszystkich cząsteczek zarówno sdrRNA jak i snoRNA poziom odnotowano dla SNORA60 w EV pochodzących z linii komórkowej U-118 MG (średnia = 2,46). Za wyjątkiem tej cząsteczki, wyższy poziom cząsteczek snoRNA w EV odnotowano w linii komórkowej U-251 MG aniżeli U-118 MG. W tej linii komórkowej najwyższy poziom został zaobserwowany dla SNORD138 (średnia = 1,22), SNORA11, SNORA51 (średnia = 1,14) oraz SNORA38B (średnia = 1,12) (Ryc. 7 D).



Rycina 7. Analiza poziomu sdrRNA oraz snoRNA w pęcherzykach zewnątrzkomórkowych (EV) GBM. A-B. Western Blot potwierdzający obecność markera CD63 we frakcji EV wyizolowanej z medium hodowlanego linii komórkowej U-251 MG (A) i U-118 MG (B). **C-D.** Heatmapa przedstawiająca poziom wybranych sdrRNA (C) oraz snoRNA (D) w EV w linii komórkowej U-118 MG i U-251 MG. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD o istotności statystycznej $p < 0,05$ i znormalizowano względem genów referencyjnych.

4.2.3. Analiza poziomu wybranych sdrRNA oraz snoRNA w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM

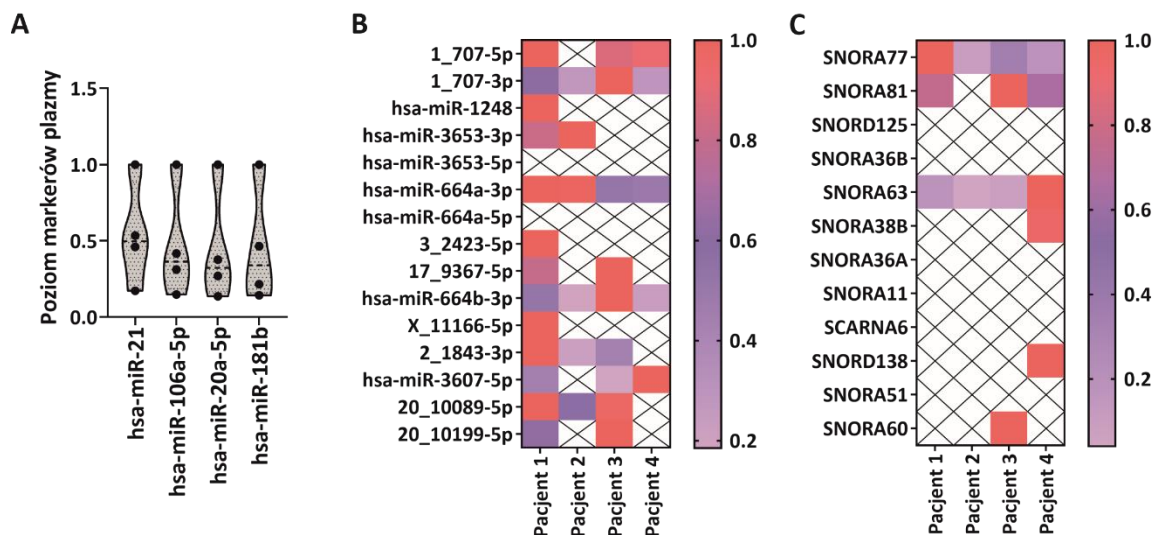
Płyny ustrojowe, takie jak krew czy płyn mózgowo-rdzeniowy, są istotnym źródłem informacji, umożliwiającym identyfikację biomarkerów RNA. Biomarkery RNA mogą być obecne w plazmie pacjentów zarówno jako wolnokrążące cząsteczki, jak i obecne w EV. Wśród nich cząsteczki miRNA czy lncRNA okazały się być obiecującymi markerami zarówno diagnostycznymi, jak i prognostycznymi pacjentów z GBM [118, 283].

Aby ocenić potencjał diagnostyczny badanych w niniejszej pracy sdrRNA oraz ich prekursorowych snoRNA, sprawdzono ich obecność w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym

GBM (n = 4). W niniejszej pracy, plazma została oddzielona od obecnych w niej komórek przy pomocy wirowania przy wysokich obrotach, tak więc obecne w niej cząsteczki są wolnokrążące, bądź mogą być obecne w EV. W pierwszej kolejności ocenie poddano poziom markerów plazmy – hsa-miR-21, hsa-miR-106a-5p, hsa-miR-20a-5p i hsa-miR-181b wybranych na podstawie danych literaturowych [161, 163, 164]. Wszystkie z wymienionych markerów były obecne we wszystkich czterech próbkach krwi pochodzących od pacjentów z GBM (Ryc. 8 A).

Kolejno zweryfikowano obecność sdRNA i snoRNA w plazmie wyizolowanej z krwi pacjentów z GBM, gdzie w znacznej większości prób została ona potwierdzona. Trzy z nich (1_707-3p, hsa-miR-664a-3p i hsa-miR-664b-3p) zostały zidentyfikowane we wszystkich czterech próbach. Cząsteczki 1_707-5p, 2_1843-3p i 20_10089-5p zaobserwowano w 75 % prób. Pozostałe cząsteczki z wyjątkiem niezidentyfikowanych w plazmie hsa-miR-3653-5p i hsa-miR-664a-5p zostały wykryte u jednego lub dwóch pacjentów (Ryc. 8 B).

W przypadku cząsteczek snoRNA, jedynie SNORA77 i SNORA63 obecne były w plazmie wszystkich pacjentów, SNORA81 obecna była w 75 % prób, natomiast SNORA38B, SNORD138 i SNORA60 w jednej próbce. Pozostałe snoRNA nie zostały wykryte w plazmie pacjentów (Ryc. 8 C).



Rycina 8. Analiza poziomu sdRNA oraz snoRNA w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. A. Poziom markerów w plazmie wyizolowanej z krwi pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Na wykresie każda kropka odpowiada jednemu pacjentowi. **B-C.** Heatmapa przedstawiająca poziom wybranych sdRNA (B) oraz snoRNA (C) w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD o istotności statystycznej $p < 0,05$ i znormalizowano względem genów referencyjnych.

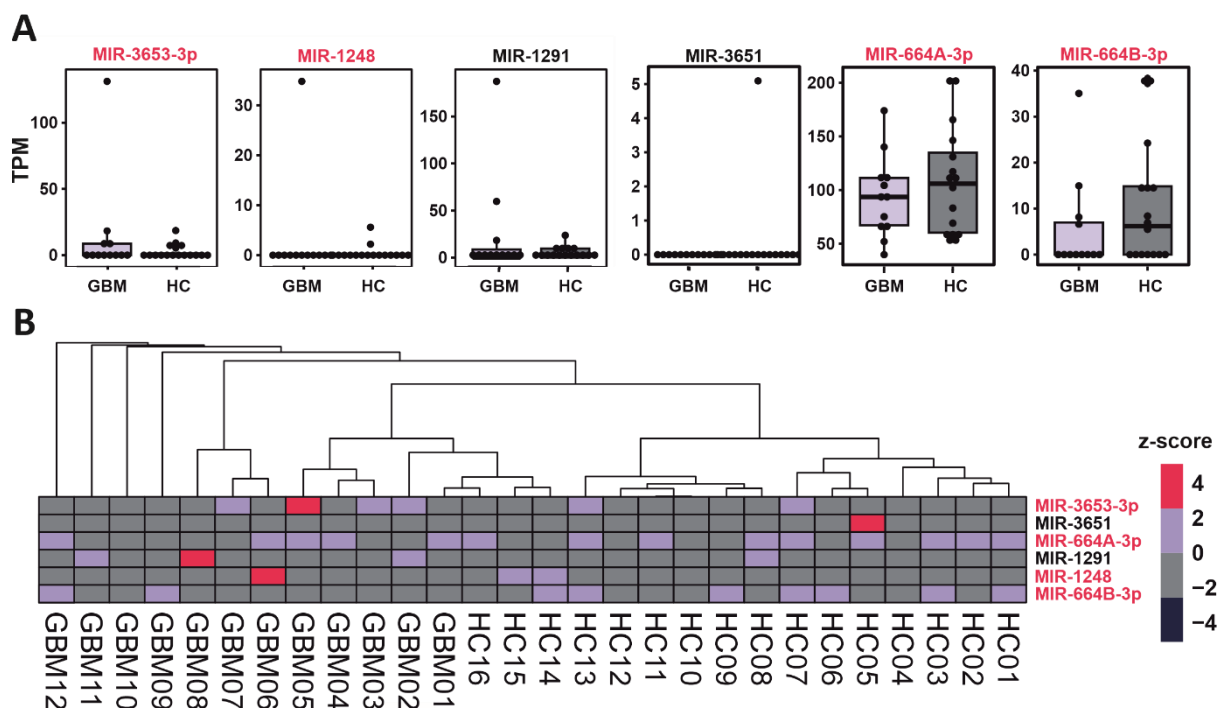
4.2.4. Analiza bioinformatyczna obecności sdRNA i snoRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM

W przeciwieństwie do wolnokrążących cząsteczek w plazmie, te obecne w EV charakteryzują się większą stabilnością, co czyni je obiecującymi biomarkerami GBM [118, 133]. Pozyskanie RNA wyizolowanego z EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM pozwoliłoby ocenić, czy obecne w EV cząsteczki sdRNA, jak i snoRNA są w stanie przekroczyć BBB i dostać się do krwioobiegu, jak również, czy te obecne w plazmie są wolnokrążące, czy znajdują się w EV. Natomiast aby ocenić potencjał diagnostyczny cząsteczek sdRNA i snoRNA, należałoby porównać ich poziom w plazmie pacjentów z GBM z plazmą zdrowych osób.

W celu porównania uzyskanych w niniejszej pracy wyników dotyczących obecności sdRNA oraz snoRNA zarówno w EV, jak i plazmie pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, posłużono się danymi pochodzącymi z sekwencjonowania RNA zaczerpniętymi z repozytorium NCBI Gene Expression Omnibus (GEO). Sekwencjonowaniu zostało poddane RNA pozyskane z EV wyizolowanych z plazmy pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz RNA z plazmy zdrowych osób z grupy kontrolnej (HC, ang. *healthy control*) dobranych pod względem wieku i płci z użyciem metody SEC, która umożliwia izolację pęcherzyków zewnątrzkomórkowych na podstawie ich rozmiaru. Podczas badań prowadzonych w ramach niniejszej pracy nie udało się pozyskać RNA z EV wyizolowanych z plazmy ze względu na niewystarczającą ilość krwi pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, z tego względu posłużono się danymi z repozytorium.

Analiza wyników sekwencjonowania zidentyfikowała obecność sześciu cząsteczek sdRNA pochodzących ze snoRNA, zarówno w EV wyizolowanych z krwi pacjentów z GBM, jak i zdrowych osób (HC). Cztery ze zidentyfikowanych sdRNA to cząsteczki badane w niniejszej pracy: hsa-miR-3653-3p, hsa-miR-1248, hsa-miR-664a-3p oraz hsa-miR-664b-3p. Największą liczbę transkryptów na milion (TPM, ang. *transcripts per milion*) wykazano dla cząsteczki hsa-miR-664a-3p, która została jednocześnie odnotowana w największej liczbie prób. Z kolei cząsteczka hsa-miR-3651 została zidentyfikowana tylko w jednej próbie pochodzącej z EV wyizolowanych z plazmy zdrowych osób (Ryc. 9 A). Heatmapa przedstawia wyniki wystandaryzowane przy pomocy z-score. Z-score dla prób GBM obrazuje, jak poziom sdRNA w konkretnej próbie (przykładowo GBM01) różni się od średniego poziomu sdRNA we wszystkich próbach GBM. Kolory czerwony i fioletowy oznaczają, że poziom sdRNA w

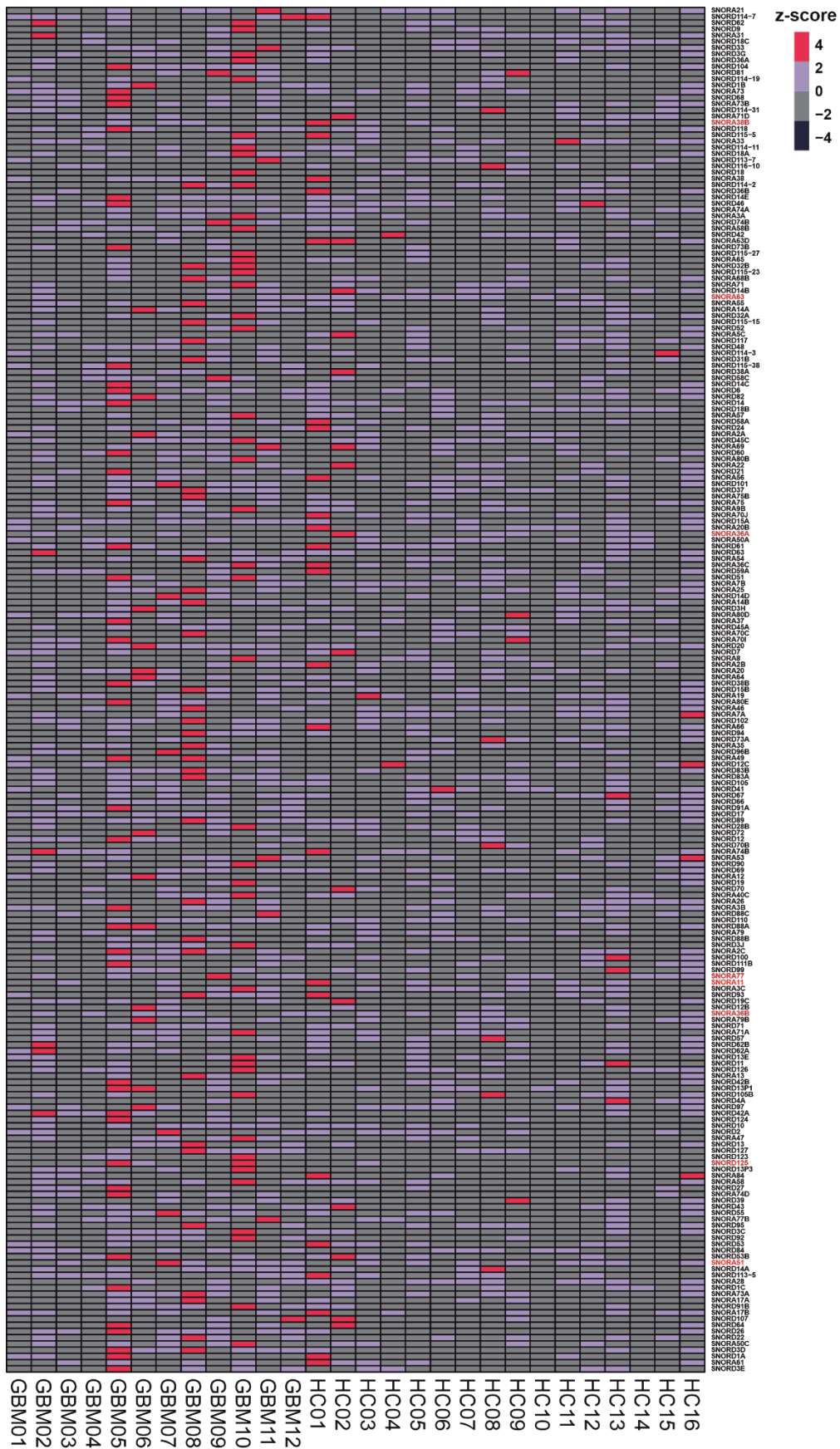
konkretnej próbie GBM jest wyższy niż średnia w grupie GBM, natomiast kolory jasnoszary i ciemnoszary oznaczają niższy poziom. Analogicznie, z-score dla prób kontrolnych należy interpretować w ten sam sposób. Przeprowadzona analiza nie wykazała żadnego wzorca poziomu zidentyfikowanych sdRNA w EV pacjentów z GBM względem kontroli. Dla sdRNA hsa-miR-664a-3p odnotowano podwyższony poziom w EV wyizolowanych z plazmy pacjentów z GBM jedynie w 40 % prób, dla pozostałych sdRNA liczba prób, gdzie poziom sdRNA u pacjentów z GBM przewyższał poziom sdRNA u osób zdrowych była niższa (Ryc. 9 B). Różnicowa analiza poziomu (DGE, ang. *Differential Gene Expression*) pomiędzy próbkami GBM a kontrolą, nie wykazała istotnie statystycznych zmian w poziomie sdRNA.



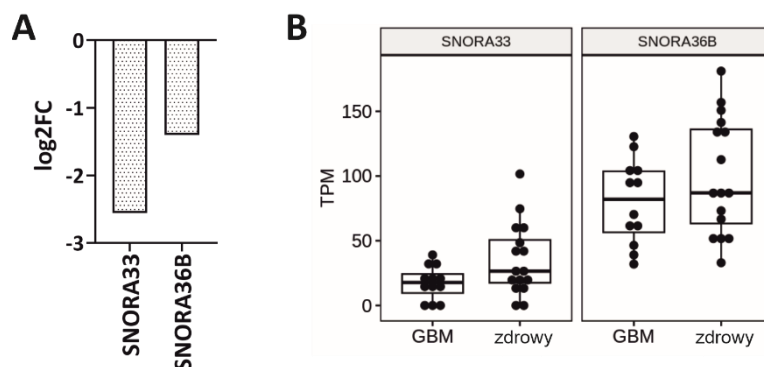
Rycina 9. Analiza obecności sdRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM i zdrowych osób. **A.** Wykres kolumnowy przedstawiający liczbę transkryptów na milion (TPM) cząsteczek sdRNA obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM i zdrowych osób. **B.** Heatmapa przedstawia poziom sdRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz zdrowych osób (HC) wystandaryzowany przy pomocy z-score. Kolorem czerwonym zaznaczono sdRNA pokrywające się z badanymi w niniejszej pracy

W przypadku cząsteczek snoRNA obecnych w EV w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, a także plazmie osób zdrowych, zidentyfikowano 219 cząsteczek. Spośród nich, 8 snoRNA pokryło się z badanymi w niniejszej pracy, należą do nich: SNORA77, SNORD125, SNORA36B, SNORA36A, SNORA38B, SNORA63, SNORA51 i SNORA11. Tak jak w przypadku opisanych powyżej sdRNA, heatmapa przedstawia wyniki

wystandaryzowane przy pomocy z-score. Wyniki wskazują, że większość snoRNA wykazuje podwyższony poziom w EV wyizolowanych z plazmy pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, aniżeli plazmy osób zdrowych (Ryc. 10). DGE snoRNA pomiędzy próbkami GBM a kontrolą (wartości \log_2FC), wykazała, że 2 cząsteczki snoRNA wykazują niższy poziom w EV wyizolowanych z plazmy pacjentów z GBM w porównaniu do plazmy zdrowych osób: SNORA33 o wartości $\log_2FC = -2,56$ oraz SNORA36B będącą jedną z badanych w niniejszej pracy snoRNA o wartości $\log_2GFC = -1,4$ (Ryc. 11 A). Wartości TPM w analizowanych próbkach dla tych cząsteczek wykazały, że liczba cząsteczek SNORA36B jest wyższa zarówno w EV wyizolowanych z plazmy pacjentów z GBM, jak i zdrowych osób w porównaniu do liczby cząsteczek SNORA33 (Ryc. 11 B).



Rycina 10. Heatmapa przedstawia poziom snRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz zdrowych osób (HC) wystandaryzowany przy pomocy z-score. Kolorem czerwonym zaznaczono snRNA pokrywające się z badanymi w niniejszej pracy.



Rycina 11. Identyfikacja snoRNA w EV obecnych w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM i zdrowych osób. **A.** Wartości log₂FC dla cząsteczek SNORA33 i SNORA36B o niższym poziomie w EV wyizolowanych z plazmy pacjentów z GBM w porównaniu do zdrowych osób. **B.** Wykres kolumnowy przedstawiający liczbę transkryptów na milion (TPM) cząsteczek SNORA33 i SNORA36B w badanych próbach.

Tabela 40 zawiera podsumowanie zgromadzonych wyników dotyczących obecności sdrRNA w EV z medium hodowlanego GBM oraz w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, a także ich poziomu w EV obecnych w plazmie pacjentów z GBM. Tabela 41 zawiera natomiast podsumowanie wyżej opisanych wyników dotyczące snoRNA.

Tabela 40. Obecność sdrRNA w EV pozyskanych z medium hodowlanego komórek GBM i w plazmie pacjentów z GBM, a także liczba prób, w których poziom sdrRNA w EV pozyskanych z plazmy pacjentów z GBM był podwyższony. Legenda: obecność w EV: +++,+++ odnotowano bardzo wysoki poziom, ++ odnotowano wysoki poziom, + odnotowano nisko poziom; obecność w plazmie: - brak; podwyższony poziom w EV w plazmie: - nie odnotowano

Nazwa sdrRNA	Obecność w EV	Obecność w plazmie (n = 4)	Podwyższony poziom w EV w plazmie (n = 12)
1_707-5p	+	3	-
1_707-3p	+	4	-
hsa-miR-1248	+	1	1
hsa-miR-3653-3p	+	2	4
hsa-miR-3653-5p	++	-	-
hsa-miR-664a-3p	+	4	5
hsa-miR-664a-5p	+	-	-
3_2423-5p	+	1	-
17_9367-5p	++	2	-
hsa-miR-664b-3p	+	4	2
X_11166-5p	+	1	-
2_1843-3p	+	3	-

hsa-miR-3607-5p	+	3	-
20_10089-5p	+	3	-
20_10199-5p	++	2	-

Tabela 41. Obecność snoRNA w EV pozyskanych z medium hodowlanego komórek GBM i w plazmie pacjentów z GBM, a także liczba prób, w których poziom sdrRNA w EV pozyskanych z plazmy pacjentów z GBM był podwyższony. Legenda: obecność w EV: +,++ odnotowano bardzo wysoki poziom, ++ odnotowano wysoki poziom, + odnotowano nisko poziom; obecność w plazmie: - brak; podwyższony poziom w EV w plazmie: - nie odnotowano

Nazwa snoRNA	Obecność w EV	Obecność w plazmie (n = 4)	Podwyższona obecność w EV w plazmie (n = 12)
SNORA77	++	4	5
SNORA81	+	3	-
SNORD125	++	-	3
SNORA36B	++	-	6
SNORA63	+	4	4
SNORA38B	+	1	3
SNORA36A	+	-	2
SNORA11	+++	-	2
SCARNA6	+	-	-
SNORD138	+	1	-
SNORA51	+	-	6
SNORA60	++++	1	-

4.3. Charakterystyka wybranych cząsteczek sdrRNA oraz snoRNA

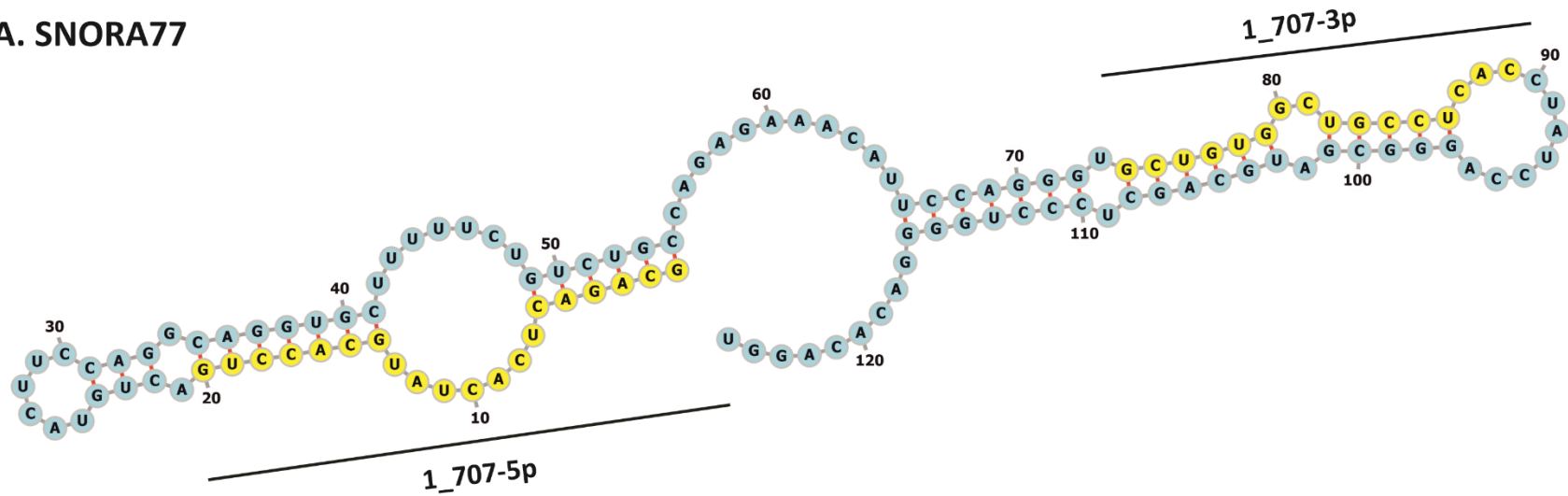
W celu określenia potencjalnej roli cząsteczek sdrRNA w GBM, do dalszych analiz wybrano cząsteczki sdrRNA charakteryzujące się najwyższym poziomem w tkankach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu, jak i wyższym poziomem w porównaniu do ich prekursorów snoRNA: 1_707-5p wraz z prekursorową SNORA77 oraz hsa-miR-1248 wraz z prekursorową SNORA81. Dodatkowo, w celu oceny potencjalnego oddziaływania między cząsteczkami sdrRNA pochodzącymi z tej samej prekursorowej, wybrano również cząsteczkę 1_707-3p pochodzącą ze SNORA77.

4.3.1. Analiza struktur drugorzędowych SNORA77 oraz SNORA81

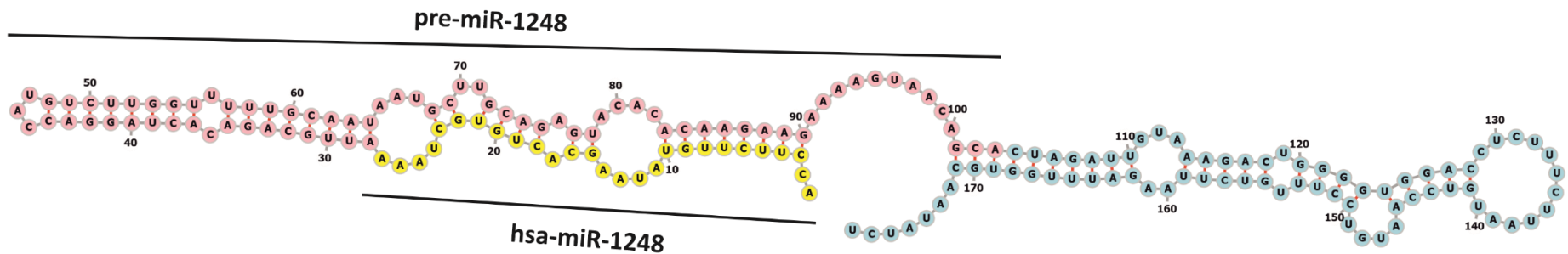
Celem ustalenia, w którym miejscu struktury snoRNA lokują się pochodzące z nich cząsteczki sdrRNA, wygenerowano struktury drugorzędowe snoRNA z użyciem narzędzia RNAfold. Wygenerowana struktura drugorzędowa SNORA77 o długości 125 nukleotydów

zawiera potencjalnie dwie cząsteczki sdRNA: 1_707-5p o długości 20 nukleotydów lokująca się pomiędzy 1 a 21 nukleotydem, umiejscowiona bliżej końca 5' oraz 1_707-3p o długości 16 nukleotydów znajdująca się pomiędzy 71 a 88 nukleotydem bliżej końca 3'. Zarówno sdRNA 1_707-5p jak i 1_707-3p sytuują się w obrębie struktury „spinki do włosów”, a dokładniej w regionach dwuniciowych, pomiędzy którymi występuje pętla wewnętrzna, a cząsteczka 1_707-3p obejmuje dodatkowo fragment pętli zewnętrznej (Ryc. 12 A). W przypadku struktury drugorzędowej SNORA81 o długości 178 nukleotydów zidentyfikowano potencjalnie sdRNA hsa-miR-1248 o długości 27 nukleotydów, lokującą się między 1 a 28 nukleotydem bliżej końca 5'. Cząsteczka hsa-miR-1248 obejmuje dwa regiony dwuniciowe przerwane dwiema pętlami wewnętrznymi. Co więcej, w obrębie sekwencji SNORA81 między 1 a 104 nukleotydem mieści się cząsteczka pre-miR-1248, która obejmuje sekwencję hsa-miR-1248 (Ryc. 12 B).

A. SNORA77



B. SNORA81

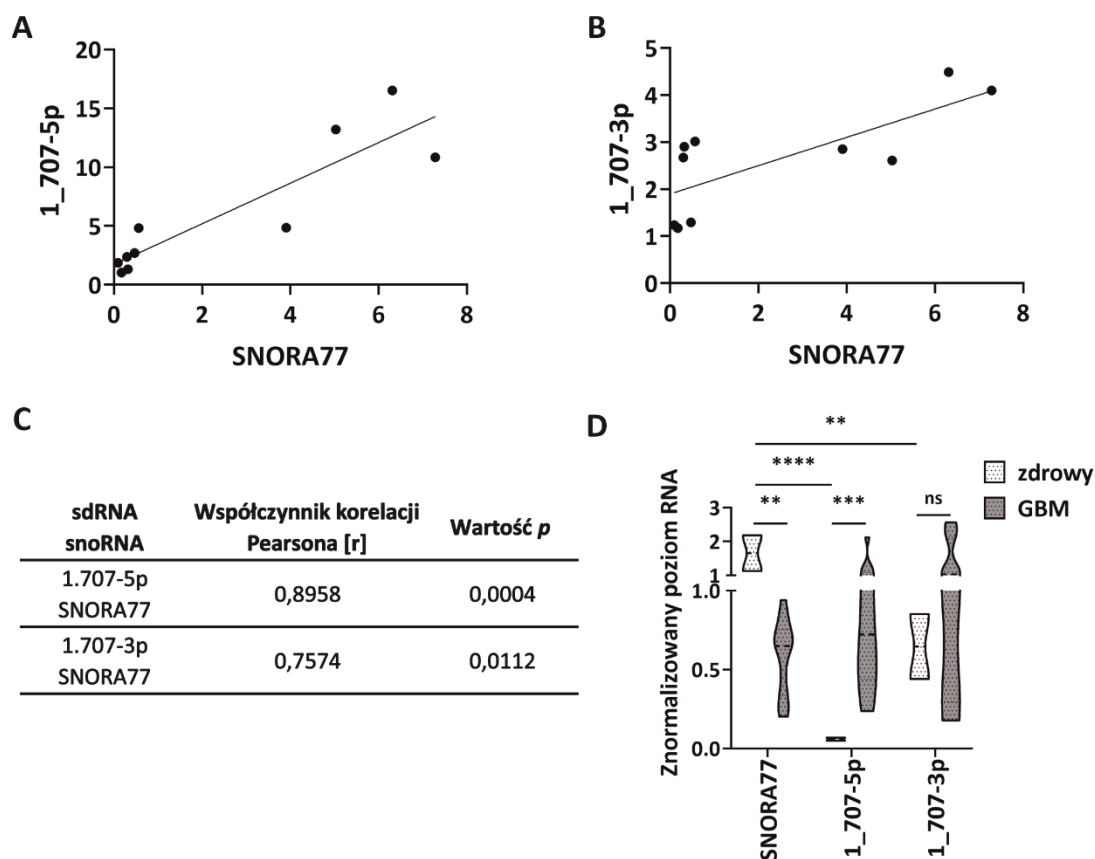


Rycina 12. Struktury drugorzędowe SNORA77 i SNORA81 wraz z lokującymi się w nich cząsteczkami sdrRNA. A. Struktura drugorzędowa SNORA77 wraz z zaznaczonymi na żółto sekwencjami sdrRNA: 1_707-5p oraz 1_707-3p. **B.** Struktura drugorzędowa SNORA81 wraz z zaznaczoną na żółto sekwencją sdrRNA hsa-miR-1248 oraz na różowo sekwencją pre-miR-1248.

4.3.2. Ocena korelacji między 1_707-5p oraz 1_707-3p a ich prekursorem SNORA77

W celu oceny potencjalnej zależności między cząsteczkami sdRNA 1_707-5p oraz 1_707-3p a ich prekursorową SNORA77 określono korelację między ich poziomami w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Analiza umożliwiła określenie, czy cząsteczka SNORA77 jest potencjalnym prekursorem dla sdRNA 1_707-5p oraz 1_707-3p oraz czy badane cząsteczki sdRNA mogą powstawać równolegle z ich prekursorową. Zarówno cząsteczka 1_707-5p, jak i 1_707-3p wykazały silną pozytywną korelację ze SNORA77 o wartości współczynnika korelacji „r” wynoszącym odpowiednio 0,8958 oraz 0,7574 (Ryc. 13 A-C).

Aby określić, czy proporcja między sdRNA a ich prekursorami zmienia się w zależności od stanu chorobowego, oceniono również poziom tych cząsteczek znormalizowany do genów referencyjnych w zdrowym mózgu oraz w tkankach GBM. W przypadku cząsteczek sdRNA 1_707-5p oraz 1_707-3p odnotowano wyższy poziom w GBM w odniesieniu do zdrowego mózgu, natomiast dla ich prekursorowej SNORA77 zaobserwowano odwrotny stosunek – poziom cząsteczki SNORA77 był wyższy w zdrowym mózgu aniżeli w GBM. Jednocześnie sdRNA 1_707-5p wykazało prawie 13-krotnie niższy poziom w zdrowym mózgu niż cząsteczka 1_707-3p (Ryc. 13 D).

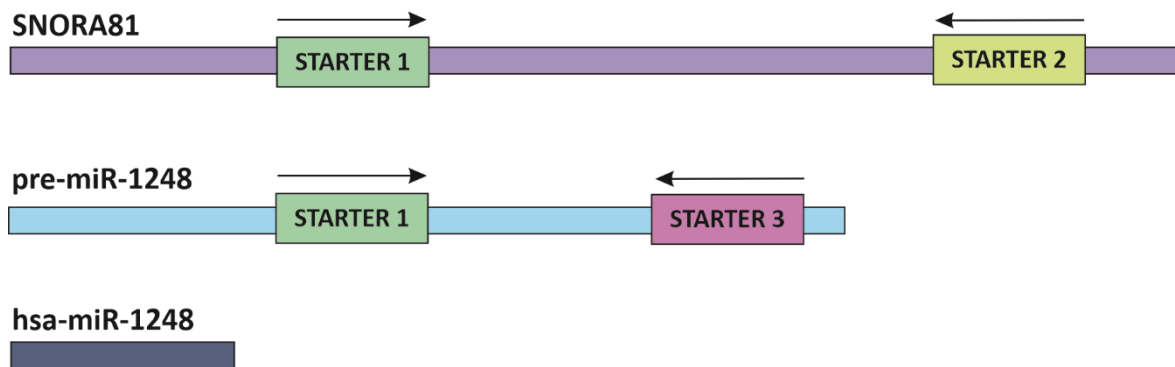


Rycina 13. Ocena korelacji między sdrRNA 1_707-5p oraz 1_707-3p a ich potencjalną prekursorową SNORA77. A-C. Współczynnik korelacji Pearsona między sdrRNA 1_707-5p (A) oraz 1_707-3p (B) a ich prekurosem SNORA77. **D.** Poziom SNORA77, 1_707-5p i 1_707-3p w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz w zdrowym mózgu. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM i znormalizowano względem genów referencyjnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.3.3. Ocena korelacji między hsa-miR-1248 a jej potencjalnymi prekursorami

Analiza struktury drugorzędowej SNORA81 wykazała, że cząsteczka pre-miR-1248 będąca potencjalnie prekurosem dla sdrRNA hsa-miR-1248 lokuje się w obrębie sekwencji SNORA81. W celu określenia, czy cząsteczka SNORA81 jest potencjalnym prekurosem zarówno dla cząsteczki pre-miR-1248, jak i hsa-miR-1248 oraz czy badane cząsteczki mogą powstawać równolegle z ich prekursorową, w pierwszej kolejności poddano ocenie poziom pre-miR-1248 w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Aby rozróżnić cząsteczkę pre-miR-1248 od cząsteczki SNORA81, startery zostały zaprojektowane w taki sposób, aby produkt amplifikacji SNORA81 nie obejmował fragmentu pre-miR-1248. Długość

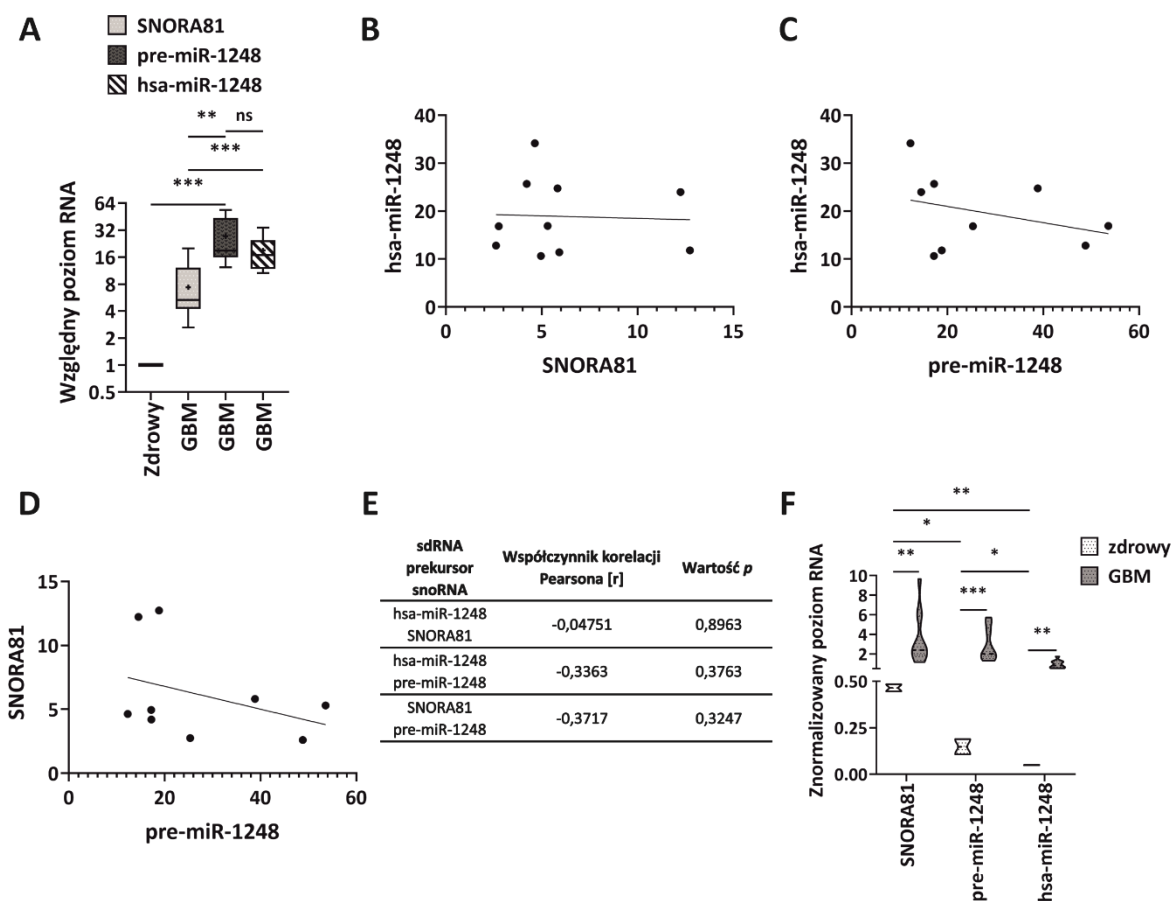
tego fragmentu wynosi zaledwie 75 nukleotydów, a zaprojektowane startery wykazywały wysoką niespecyficzność bądź łączyły się w dimery. Z tego względu zaprojektowano startery tak, aby starter sensowny (ang. *forward*) był taki sam dla amplifikacji obydwu cząsteczek, a starter antysensowny (ang. *reverse*) dla cząsteczki SNORA81 obejmował fragment sekwencji nieobejmujący pre-miR-1248. Schemat zaprojektowanych starterów został przedstawiony na Rycinie 14. Następnie, w celu oceny poziomu cząsteczki pre-miR-1248, poziom obydwu cząsteczek: pre-miR-1248 oraz SNORA81 zostały znormalizowane do genów referencyjnych, kolejno od poziomu pre-miR-1248 odjęto poziom cząsteczki SNORA81, a następnie wynik ten został przyrównany do zdrowego mózgu.



Rycina 14. Schemat projektowania starterów w celu identyfikacji cząsteczek SNORA81 oraz pre-miR-1248. Para starterów 1 i 2 służy do amplifikacji cząsteczki SNORA81, natomiast para starterów 1 i 3 do amplifikacji zarówno cząsteczki pre-miR-1248 jak i SNORA81.

Podobnie jak w przypadku cząsteczek SNORA81 oraz hsa-miR-1248, odnotowano, że poziom cząsteczki pre-miR-1248 w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM był wyższy aniżeli w zdrowym mózgu (ponad 27-krotnie). Jednocześnie, pre-miR-1248 wykazał podwyższony poziom również względem SNORA81 (prawie 5-krotnie wyższy) i hsa-miR-1248 (prawie 1,5-krotnie wyższy) (Ryc. 15 A). Kolejno ocenie została poddana korelacja między cząsteczkami SNORA81, pre-miR-1248 i hsa-miR-1248. Wyniki wskazały na brak istotnej statystycznie korelacji zarówno między hsa-miR-1248 a SNORA81, hsa-miR-1248 a pre-miR-1248 oraz SNORA81 a pre-miR-1248 (Ryc. 15 B-E). Ocena znormalizowanego poziomu tych cząsteczek w zdrowym mózgu i tkankach GBM wykazała wyraźnie wyższy poziom wszystkich cząsteczek w GBM aniżeli w zdrowym mózgu. Jednocześnie zaobserwowano, że w zdrowym mózgu najwyższy poziom wykazała cząsteczka SNORA81

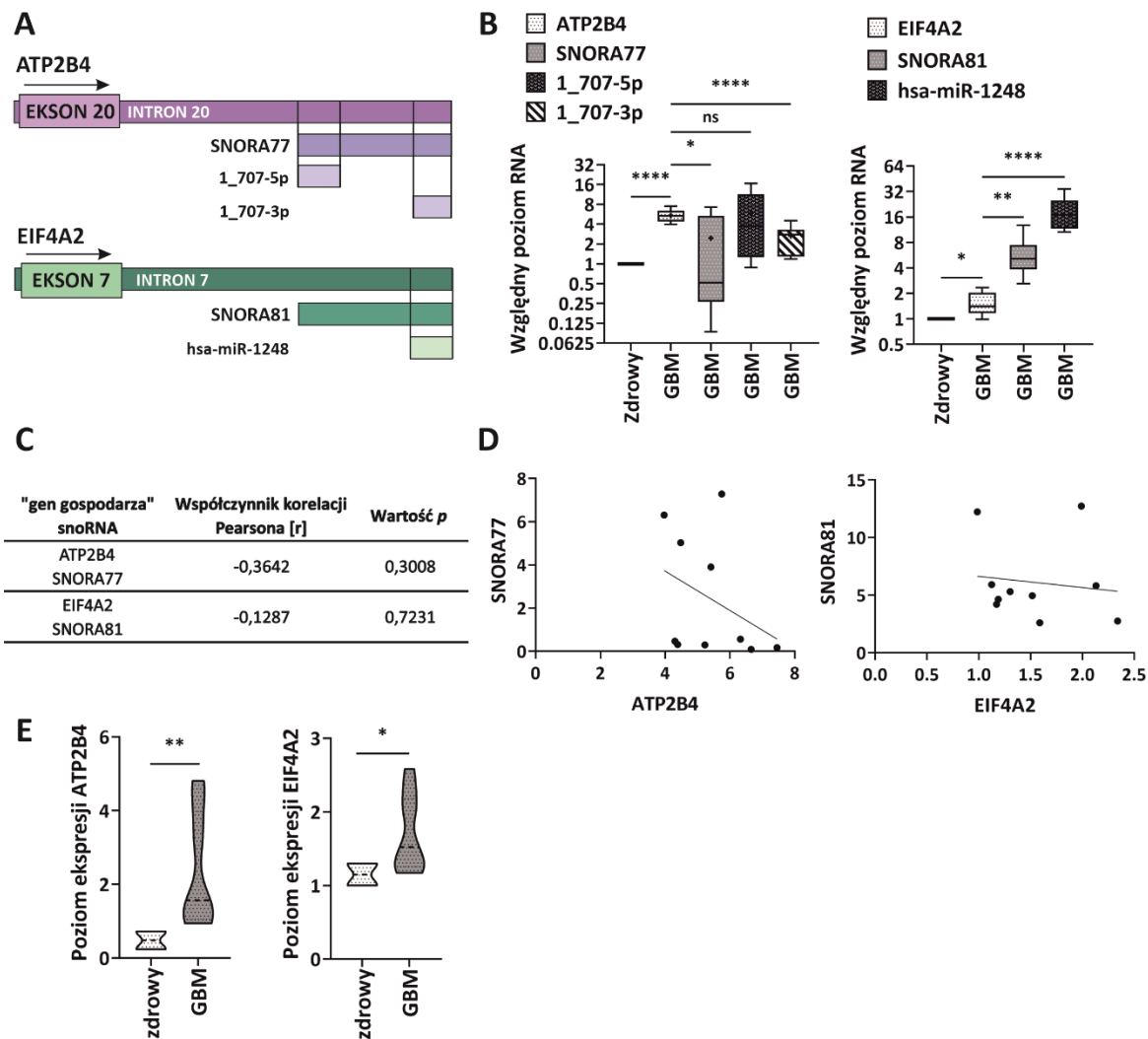
(0,46) a dla potencjalnie powstających z niej cząsteczek pre-miR-1248 oraz hsa-miR-1248 odnotowano tendencję spadkową – poziom cząsteczki pre-miR-1248 był ponad 3-krotnie niższy aniżeli SNORA81, a poziom cząsteczki hsa-miR-1248 prawie 3-krotnie niższy niż pre-miR-1248 i ponad 9-krotnie niższy niż SNORA81 (Ryc. 15 F).



Rycina 15. Ocena korelacji między hsa-miR-1248 a jej potencjalnymi prekursorami pre-miR-1248 oraz SNORA81. A. Względny poziom SNORA81, pre-miR-1248 oraz hsa-miR-1248 w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Na wykresie, linia na kolumnie reprezentuje medianę, natomiast znak „+” średnią wartość. **B-E.** Współczynnik korelacji Pearsona między hsa-miR-1248 a SNORA81 (**B**), hsa-miR-1248 a pre-miR-1248 (**C**), SNORA81 a pre-miR-1248 (**D**). **F.** Poziom SNORA81, pre-miR-1248 oraz hsa-miR-1248 w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz w zdrowym mózgu. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM i znormalizowano względem genów referencyjnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.3.4. Ocena zależności między snoRNA a ekspresją „genów gospodarza”

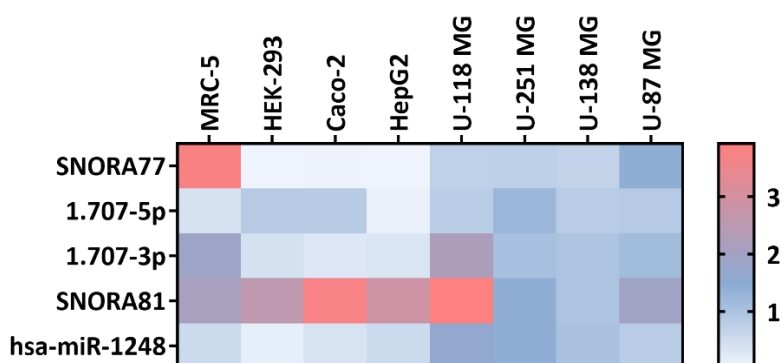
Większość „genów gospodarza” (ang. *host genes*), z których intronów powstają snoRNA to geny kodujące białka, ale mogą to być również geny niekodujące białek [180]. SNORA77 pochodzi z intronu 20 genu *ATP2B4*, kodującego białko błonowe PMCA4 (Ryc. 16 A). Należy ono do rodziny ATPaz transportujących dwuwartościowe jony wapnia na zewnątrz komórek eukariotycznych [284]. SNORA81 pochodzi natomiast z intronu 7 genu *EIF4A2* kodującego cytoplazmatyczne białko EIF4A2 - podjednostkę kompleksu eIF4F biorącą udział w rozpoznawaniu czapeczki, jak i wymagana do wiązania mRNA z rybosomem [285] (Ryc. 16 A). Ekspresja transkryptów *ATP2B4* oraz *EIF4A2* została zbadana w tych samych 12 tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, w których ocenie poddano poziom cząsteczek snoRNA oraz sdRNA. Zarówno *ATP2B4* jak i *EIF4A2* wykazały podwyższony poziom ekspresji w tkankach GBM w porównaniu do zdrowego mózgu. Gen *ATP2B4* uległ ponad 5-krotnie wyższej ekspresji względem kontroli, przy jednoczesnym 2-krotnie wyższym poziomie w porównaniu do cząsteczek SNORA77 i 1_707-3p i podobnym w odniesieniu do sdRNA 1_707-5p. Z kolei *EIF4A2* uległ ponad 1,5-krotnie wyższej ekspresji w tkankach pacjentów względem zdrowego mózgu, jednakże wykazuje niższy poziom aniżeli SNORA81 (4-krotnie niższy) i hsa-miR-1248 (12-krotnie niższy) (Ryc. 16 B). Analiza korelacji między „genami gospodarza” a pochodzącymi od nich snoRNA, nie wykazała istotnie statystycznej zależności zarówno między *ATP2B4* i SNORA77, jak i *EIF4A2* i SNORA81 (Rys. 16 C-D). Aby ocenić potencjalny udział transkryptów *ATP2B4* i *EIF4A2* w gliomagenezie, określono ich poziom ekspresji w zdrowym mózgu jak i tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. W obydwu przypadkach zaobserwowano wyższy poziom ekspresji w tkankach GBM aniżeli w zdrowym mózgu: prawie 5-krotnie wyższy w przypadku *ATP2B4* i 1,5-krotnie wyższy w przypadku *EIF4A2* (Rys. 16 E).



Rycina 16. Ocena korelacji między SNORA77 oraz SNORA81 a ekspresją „genów gospodarza”.
A. Schemat przedstawia lokalizację cząsteczek snoRNA oraz sdRNA w sekwencji „genów gospodarza”.
B. Względny poziom ekspresji genów „gospodarza” oraz względny poziom wybranych snoRNA i sdRNA w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Na wykresie, linia na kolumnie reprezentuje medianę, natomiast znak „+” średnią wartość. **C-D.** Współczynnik korelacji Pearsona między „genami gospodarza” a pochodzącymi z nich snoRNA. **E.** Poziom ekspresji „genów gospodarza” w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM oraz w zdrowym mózgu. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM i znormalizowano względem genów referencyjnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.3.5. Ocena tkankowo-zależnej specyficzności występowania wybranych sdRNA oraz snoRNA w liniach komórkowych GBM i nie-GBM

Aby ocenić tkankowo-zależną specyficzność występowania wybranych sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA, oceniono ich poziom w wybranych liniach komórkowych: zdrowej linii fibroblastów płucnych (MRC-5), zdrowej linii nerki (HEK-293), liniach pochodzących z raka jelita grubego (Caco-2) i raka wątroby (HepG2) oraz czterech liniach komórkowych GBM (U-118 MG, U-251 MG, U-138 MG, U-87 MG). Częsteczka hsa-miR-1248 wykazała podwyższony poziom we wszystkich liniach GBM w porównaniu do innych nowotworów, czy zdrowych tkanek. Podobną sytuację zaobserwowano dla cząsteczki SNORA77, z wyjątkiem jej wysokiego poziomu w zdrowych fibroblastach płucnych (ponad 100-krotnie wyższy niż w innych liniach komórkowych nie-GBM i około 5-krotnie wyższy poziom niż w GBM). Wysoki poziom w linii komórkowej MRC-5 odnotowano również dla sdRNA 1_707-3p pochodzącej ze SNORA77. Druga pochodna SNORA77 – 1_707-5p wykazała podwyższony poziom w liniach GBM, ale również w zdrowej nerce oraz raku jelita grubego. SNORA81 natomiast charakteryzowała się podwyższonym poziomem w liniach komórkowych nie-GBM w porównaniu z liniami GBM z wyjątkiem jej wysokiego poziomu w linii U-118 MG. Dodatkowo zaobserwowano również podwyższony poziom SNORA77 i SNORA81 w linii komórkowej U-87 MG (Ryc. 17). Ze względu na wysoki poziom wszystkich badanych cząsteczek w liniach komórkowych U-118 MG oraz U-251 MG, szczególnie cząsteczek sdRNA, zostały one wybrane jako linie modelowe w dalszych badaniach.



Rycina 17. Heatmapa przedstawiająca zróżnicowany poziom wybranych snoRNA i sdRNA w różnych liniach komórkowych GBM oraz nie-GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD i znormalizowano względem genów referencyjnych. MRC-5 – zdrowe fibroblasty płucne, HEK-293 – zdrowa nerka, Caco-2 – rak jelita grubego, HepG2 – rak wątroby, U-118 MG, U-251 MG, U-138 MG, U-87 MG – glejak wielopostaciowy (GBM).

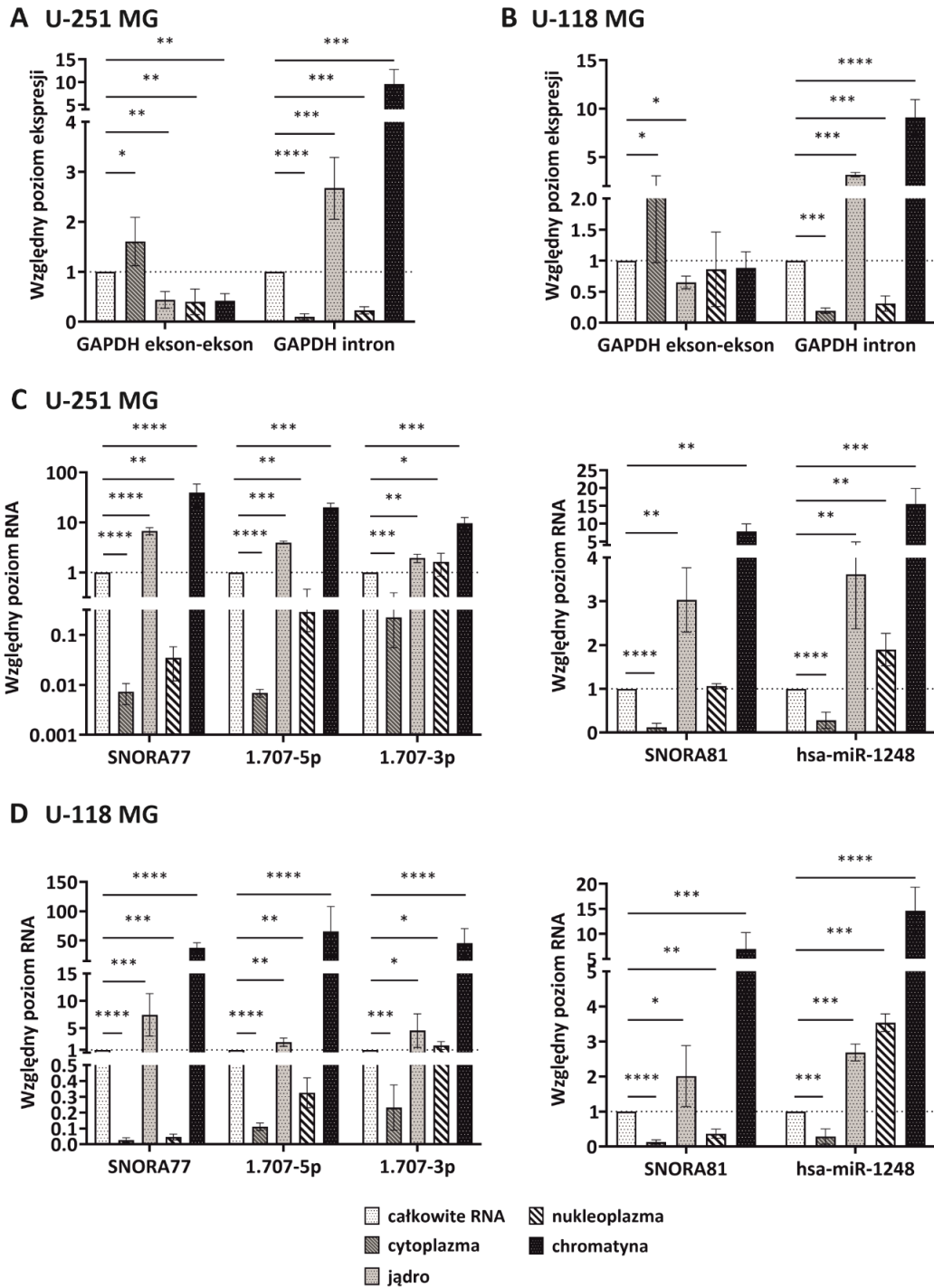
4.3.6. Określenie subkomórkowo-zależnej specyficzności występowania wybranych sdRNA oraz snoRNA

SnoRNA są zlokalizowane głównie w jąderkach i ciałkach Cajala, a także mogą krążyć pomiędzy nimi [174]. Dowiedziono, że większość pochodzących z nich cząsteczek sdRNA również lokuje się w jądrze, jednakże ze względu na doniesienia o pełnionej przez nie funkcji w procesie interferencji RNA, mogą być one także obecne w cytoplazmie [175, 219, 220]. Celem poznania zarówno miejsca biogenezy jak i potencjalnych funkcji wybranych sdRNA, w pierwszej kolejności ocenie poddano ich lokalizację subkomórkową zarówno w komórkach GBM (U-251 MG, U-118 MG) jak i linii zdrowych fibroblastów płucnych (MRC-5). Aby potwierdzić prawidłowość wykonanego frakcjonowania, określono poziom ekspresji markerów cytoplazmatycznych (GAPDH ekson-ekson) i jądrowych (GAPDH intron). Startery użyte do amplifikacji markera cytoplazmatycznego zaprojektowane zostały w obrębie sekwencji ekson-ekson transkryptu GAPDH, a do markera jądrowego w obrębie sekwencji intronu 2 transkryptu GAPDH.

W przypadku linii GBM, zaobserwowano podwyższoną ekspresję GAPDH ekson-ekson w cytoplazmie w porównaniu do frakcji całkowitego RNA w linii komórkowej U-251 MG (Ryc. 18 A), jak i U-118 MG (Ryc. 18 B), przy jednoczesnym obniżonym poziomie ekspresji tego markera w jądrze, nukleoplazmie i frakcji RNA związanych z chromatyną w obydwu liniach komórkowych GBM (Ryc. 18 A-B). Równocześnie prawidłowość wykonanego eksperymentu potwierdziła znacznie zwiększona ekspresja markera GAPDH intron w jądrze, jak i frakcji RNA związanej z chromatyną, zarówno w linii U-251 MG (Ryc. 18 A), jak i U-118 MG (Ryc. 18 B).

Wykazano, że wszystkie wybrane sdRNA oraz ich prekursorowe snoRNA były obecne w jądrze, a ich udział we frakcji cytoplazmatycznej był niemal zerowy (Ryc. 18 C-D). Jednocześnie, poziom wszystkich wybranych cząsteczek sdRNA jak i snoRNA był najwyższy we frakcji związanej z chromatyną zarówno w linii komórkowej U-251 MG jak i U-118 MG (Ryc. 18 C-D). W przypadku cząsteczki 1_707-5p odnotowano nawet 65-krotnie wyższy, a dla cząsteczki 1_707-3p nawet 45-krotnie wyższy poziom w tej frakcji w porównaniu z frakcją całkowitego RNA w linii komórkowej U-118 MG (Ryc. 18 D). W przypadku ich prekursorowej SNORA77 zaobserwowano 40-krotnie wyższy poziom w tej frakcji w linii komórkowej U-251 MG (Ryc. 18 C). Jednocześnie SNORA77 wykazała najwyższy poziom w jądrze ze wszystkich cząsteczek (ponad 7-krotnie wyższy niż we frakcji całkowitej RNA) w obydwu liniach

komórkowych GBM (Ryc. 18 C-D). W przypadku cząsteczki hsa-miR-1248 zaobserwowano jej wyższy poziom zarówno w jądrze, jak i frakcji związanej z chromatyną w porównaniu z jej prekursorową SNORA81 w obydwu liniach komórkowych (Ryc. 18 C-D). Co więcej, dla cząsteczek sdRNA 1.707-3p i hsa-miR-1248 odnotowano również podwyższony poziom w nukleoplazmie w porównaniu do frakcji całkowitej RNA (Ryc. 18 C-D).

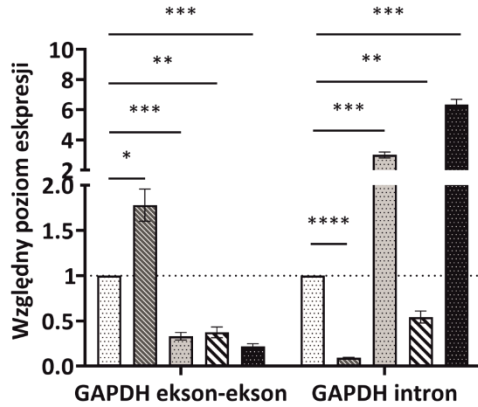


Rycina 18. Lokalizacja subkomórkowa wybranych cząsteczek snoRNA oraz sdRNA w GBM. A-B. Względny poziom ekspresji markerów frakcjonowania subkomórkowego we frakcji jądrowej, cytoplazmatycznej, nukleoplazmie oraz frakcji RNA związanych z chromatyną w linii komórkowej U-251 MG (A) i U-118 MG (B). **C-D.** Względny poziom wybranych sdRNA i snoRNA we frakcji jądrowej, cytoplazmatycznej, nukleoplazmie oraz frakcji RNA związanych z chromatyną w linii komórkowej U-251 MG (C) i U-118 MG (D). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do frakcji całkowitej RNA. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

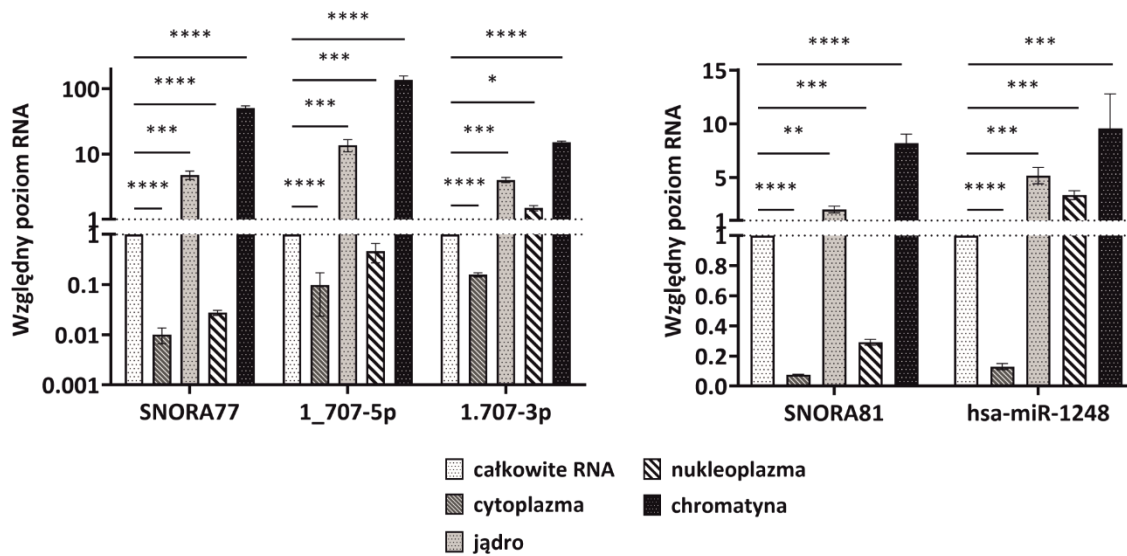
Zarówno białka, jak i RNA mogą zmieniać swoją lokalizację subkomórkową w różnych stanach patologicznych, w tym nowotworach. Zmiana lokalizacji ma znaczenie dla sieci interakcji a także pełnionej funkcji, wpływając na rozwój i inwazję nowotworu [286, 287]. Aby ocenić, czy jądrowa lokalizacja wybranych sdRNA jest specyficzna dla GBM, zbadano ich poziom również w linii komórkowej zdrowych fibroblastów płucnych (MRC-5). Poziom ekspresji markerów cytoplazmatycznego i jądrowego w poszczególnych frakcjach potwierdziły poprawność wykonanego eksperymentu (Ryc. 19 A).

Potwierdzono jednocześnie obecność wszystkich wybranych sdRNA wraz z ich prekursorowymi snoRNA w jądrze komórkowym (Ryc. 19 B). Najwyższy poziom w jądrze względem frakcji całkowitej RNA odnotowano dla sdRNA 1.707-5p (ponad 13-krotnie wyższy). Podobnie jak w liniach komórkowych GBM, najwyższy poziom wszystkich badanych cząsteczek sdRNA i snoRNA został określony we frakcji RNA związanej z chromatyną (prawie 140-krotnie wyższy dla sdRNA 1.707-5p i ponad 50-krotnie wyższy dla jej prekursorowej SNORA77). W przypadku hsa-miR-1248 zaobserwowano wyższy poziom zarówno w jądrze, jak i frakcji związanej z chromatyną w porównaniu z jej prekursorową SNORA81 również w linii komórkowej MRC-5. W linii fibroblastów płucnych, również dla tych samych cząsteczek sdRNA: 1.707-3p i hsa-miR-1248 odnotowano podwyższony poziom w nukleoplazmie w porównaniu do frakcji całkowitej RNA (Ryc. 19 B).

A MRC-5

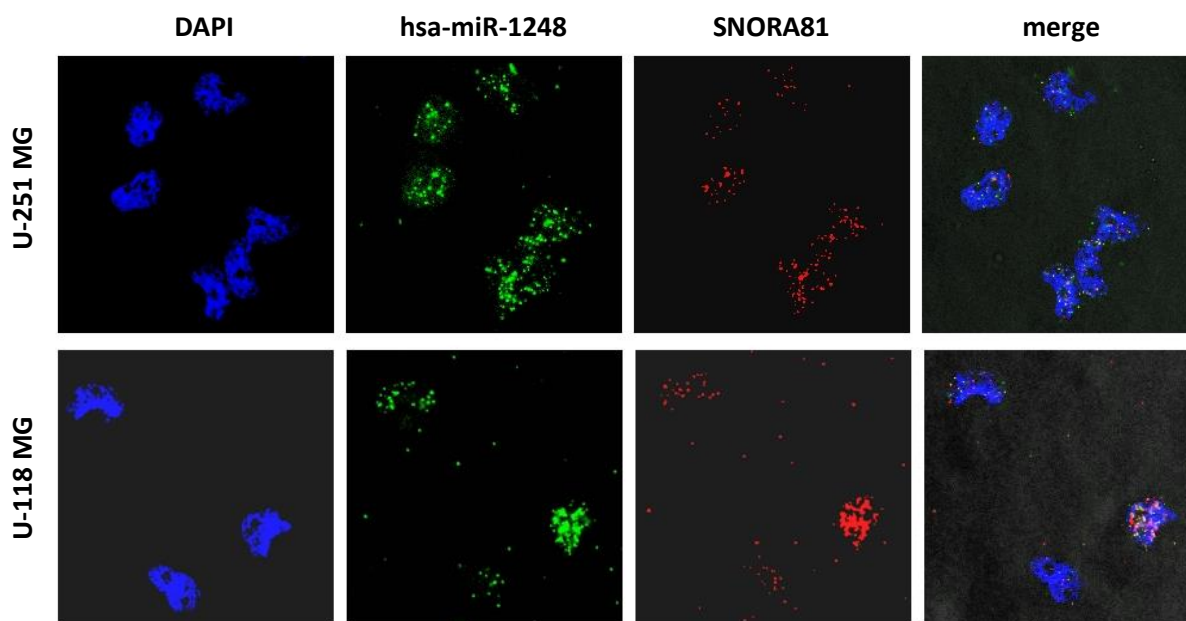


B MRC-5



Rycina 19. Lokalizacja subkomórkowa wybranych cząsteczek snoRNA oraz sdrRNA w zdrowych fibroblastach płucnych. A. Względny poziom ekspresji markerów frakcjonowania subkomórkowego we frakcji jądrowej, cytoplazmatycznej, nukleoplazmie oraz frakcji RNA związanych z chromatyną w linii komórkowej MRC-5. **B.** Względny poziom wybranych sdrRNA i snoRNA we frakcji jądrowej, cytoplazmatycznej, nukleoplazmie oraz frakcji RNA związanych z chromatyną w linii komórkowej MRC-5. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do frakcji całkowitej RNA. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

Doniesienia literaturowe wskazują na możliwe działanie hsa-miR-1248 w procesie interferencji RNA poprzez obniżenie poziomu ekspresji OGG1 [246]. Sugerować to może jego cytoplazmatyczną lokalizację w astrocytach, dlatego też w celu dokładnej oceny lokalizacji subkomórkowej tej cząsteczki, przeprowadzono badanie z wykorzystaniem znakowania fluorescencyjnego i detekcji z wykorzystaniem metody FISH. Zastosowano sondy znakowane fluorescencyjnie zaprojektowane wobec sekwencji hsa-miR-1248 oraz jej prekursorowej SNORA81. Wyniki wskazują na jądrową lokalizację obydwu badanych cząsteczek zarówno w linii komórkowej U-251 MG jak i U-118 MG (Ryc. 20).



Rycina 20. Lokalizacja subkomórkowa SNORA81 oraz hsa-miR-1248 w komórkach GBM z wykorzystaniem metody FISH. Niebieska fluorescencja (DAPI) – jądro komórkowe; zielona fluorescencja (FITC) – sonda na hsa-miR-1248; czerwona fluorescencja (Cy3) – sonda na SNORA81; merge – jednocześnie zastosowane sondy na hsa-miR-1248 i SNORA81.

4.3.7. Poziom wybranych sdrRNA oraz snoRNA w warunkach niedoboru tlenu

Wykazano, że niesprzyjające warunki środowiska nowotworu, jakim jest niedotlenienie, mają wpływ na zróżnicowany profil ekspresji ncRNA w GBM, w szczególności lncRNA i miRNA. Te z kolei mogą być zaangażowane w procesy autofagii indukowanej hipoksją, adaptacji komórek do warunków stresowych, a także wykazują związek z gorszym rokowaniem wśród pacjentów [115, 288-291]. Dowiedziono, że nisza hipoksyjna jest ważna dla utrzymania populacji GSC, odgrywającej kluczową rolę nie tylko w przeżyciu komórek, ale także w ich różnicowaniu i inwazji [92, 106]. W związku z powyższymi doniesieniami literaturowymi, w celu przybliżenia potencjalnej roli sdrRNA w procesach związanych z

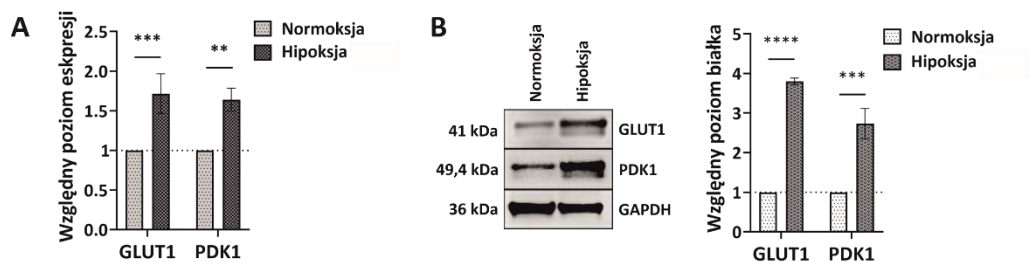
niedotlenieniem, oceniono poziom zarówno wybranych sdRNA, jak i ich prekursorowych snoRNA w warunkach niedoboru tlenu (1 % O₂ - hipoksja) w porównaniu do standardowych warunków hodowli (21 % O₂ – normoksja).

W pierwszej kolejności oceniono markery hipoksji GLUT1 oraz PDK1 zarówno na poziomie mRNA jak i białka. Zaobserwowano podwyższony poziom wybranych markerów w linii komórkowej U-251 MG (ponad 1,5-krotnie wyższy poziom ekspresji mRNA w przypadku obydwu markerów oraz prawie 4-krotnie wyższy poziom białka GLUT1 i ponad 2,5-krotnie wyższy poziom białka PDK1 w porównaniu do kontroli) (Ryc. 21 A-B), jak i U-118 MG (ponad 6-krotnie wyższy poziom ekspresji mRNA oraz prawie 4-krotnie wyższy poziom białka GLUT1 i ponad 6,5-krotnie wyższy poziom białka PDK1 w porównaniu do kontroli) (Ryc. 21 C-D).

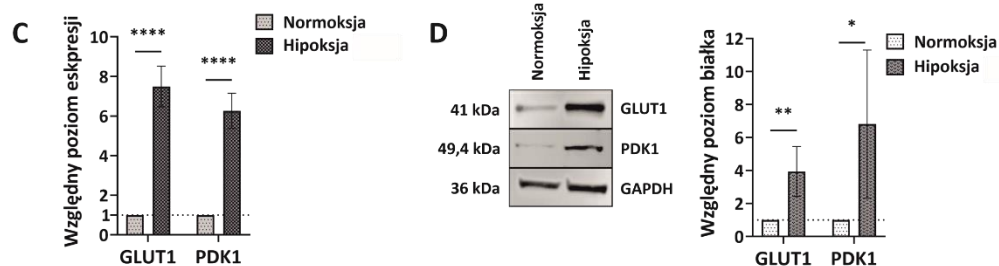
Analiza poziomu wybranych snoRNA oraz sdRNA wskazała na obniżony poziom sdRNA 1_707-5p, 1_707-3p oraz hsa-miR-1248 w warunkach niedoboru tlenu, podczas gdy poziom ich prekursorowych SNORA77 oraz SNORA81 ulega nawet 2,5-krotnemu podwyższeniu w przypadku SNORA77 w linii komórkowej U-118 MG (Ryc. 21 E-F). Dla cząsteczki 1_707-5p zaobserwowano 40 % obniżenie poziomu w linii komórkowej U-251 MG (Ryc. 21 E) oraz prawie 60 % obniżenie poziomu w linii komórkowej U-118 MG (Ryc. 21 F). W przypadku cząsteczek sdRNA 1_707-3p oraz hsa-miR-1248 poziom w obydwu liniach spadł o mniej więcej 30 % (Ryc. 21 E-F).

Aby ocenić, czy podwyższony poziom badanych snoRNA w hipoksji ma związek z potencjalną funkcją tych cząsteczek w warunkach stresowych, czy jest efektem zwiększonej ekspresji ich „genów gospodarza”, ocenie poddano również poziom transkryptów ATP2B4 oraz EIF4A2, z których powstają kolejno SNORA77 i SNORA81. Nie zaobserwowano zmian poziomów ekspresji „genów gospodarza” w warunkach niedoboru tlenu zarówno w linii komórkowej U-251 MG (Ryc. 22 A), jak i U-118 MG (Ryc. 22 B).

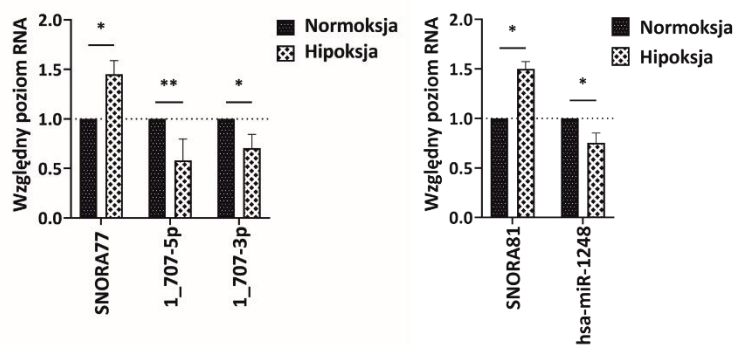
U-251 MG



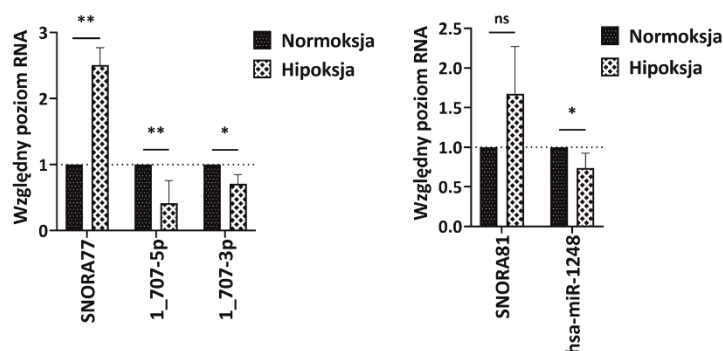
U-118 MG



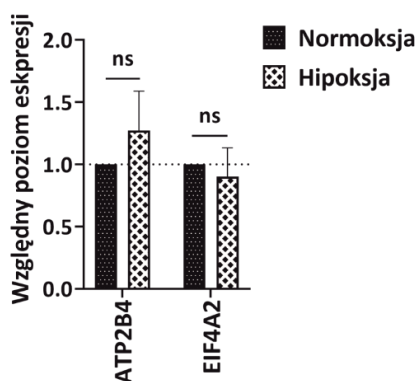
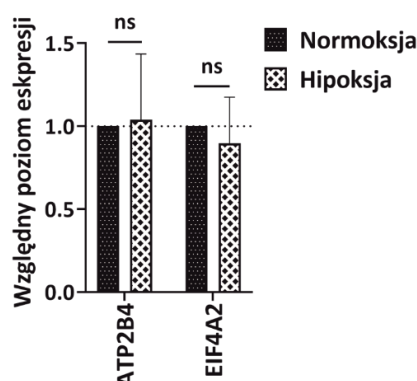
E U-251 MG



F U-118 MG



Rycina 21. Poziom wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA w warunkach niedoboru tlenu. A. Względny poziom ekspresji markerów hipoksji – GLUT1 i PDK1 w linii komórkowej U-251 MG. **B.** Poziom białka markerów hipoksji – GLUT1 i PDK1 w linii komórkowej U-251 MG. **C.** Względny poziom ekspresji markerów hipoksji – GLUT1 i PDK1 w linii komórkowej U-118 MG. **D.** Poziom białka markerów hipoksji – GLUT1 i PDK1 w linii komórkowej U-118 MG. **E-F.** Względny poziom wybranych cząsteczek sdRNA i snoRNA w warunkach niedoboru tlenu w linii komórkowej U-251 MG (**E**) oraz U-118 MG (**F**). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do warunków normoksji. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

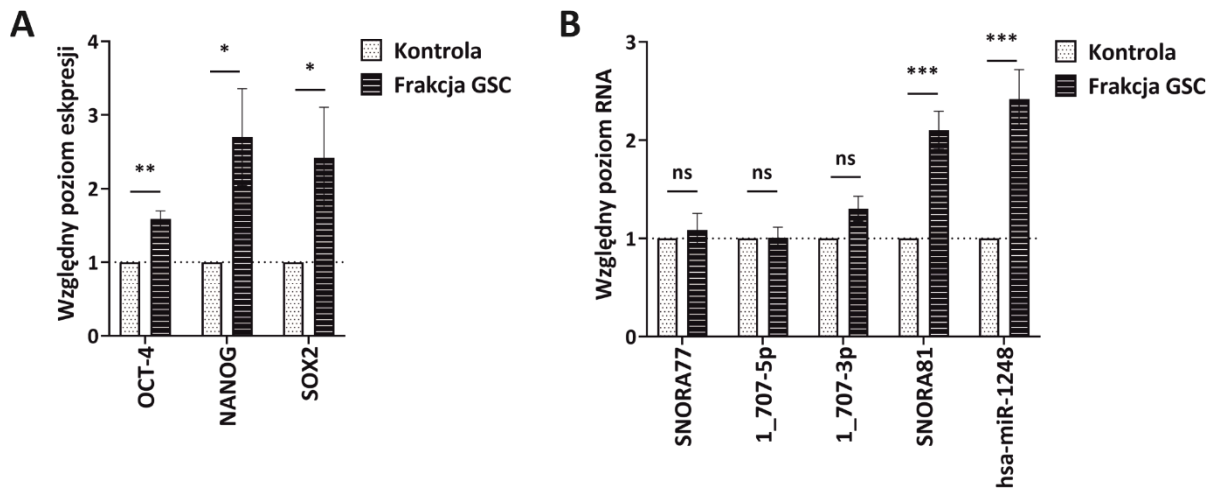
A U-251 MG**B U-118 MG**

Rycina 22. Poziom ekspresji „genów gospodarza” w warunkach niedoboru tlenu. A-B. Względny poziom ekspresji „genów gospodarza” – ATP2B4 i EIF4A2 w linii komórkowej U-251 MG (A) i U-118 MG (B). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do warunków normoksji. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.3.8. Poziom wybranych sdrRNA oraz snoRNA we frakcji komórek macierzystych GBM (GSC)

W celu oceny obecności sdrRNA, jak i ich prekursorów w populacji GSC, linia komórkowa U-251 MG została frakcjonowaniu z wykorzystaniem gotowego zestawu odczynników z przeciwciałem przeciwko CD133 – markerowi obecnemu na powierzchni GSC.

W pierwszej kolejności zidentyfikowano poziom ekspresji markerów frakcji GSC. Odnotowano ponad 1,5-krotnie wyższy poziom ekspresji OCT-4 oraz ponad 2,5-krotnie wyższy dla NANOG i SOX2 (Ryc. 23 A). W przypadku sdrRNA, zaobserwowano prawie 2,5-krotnie podwyższony poziom dla cząsteczki hsa-miR-1248 w porównaniu do kontroli, dla cząsteczek 1_707-5p oraz 1_707-3p nie odnotowano zmian. Natomiast w przypadku cząsteczek snoRNA, poziom cząsteczki SNORA81 wzrósł ponad 2-krotnie we frakcji GSC w odniesieniu do kontroli, a poziom SNORA77 nie zmienił się (Ryc. 23 B).

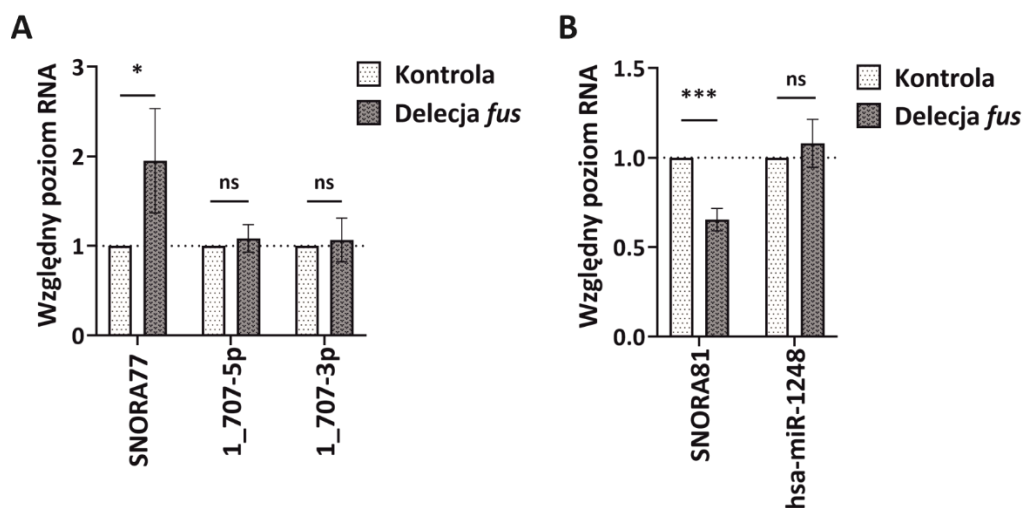


Rycina 23. Poziom wybranych cząsteczek sdrRNA oraz snoRNA we frakcji komórek macierzystych GBM (GSC). **A.** Względny poziom ekspresji markerów frakcji komórek macierzystych – OCT-4, NANOG i SOX2 w linii komórkowej U-251 MG. **B.** Względny poziom wybranych cząsteczek sdrRNA i snoRNA we frakcji komórek macierzystych w linii komórkowej U-251 MG. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do kontroli. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4. Interakcje sdrRNA oraz snoRNA z wybranymi białkami

4.4.1. Ocena poziomu wybranych sdrRNA i snoRNA w komórkach GBM z delecją genu *FUS*

Analiza wyników sekwencjonowania komórek z delecją genu *FUS* ujawniła szereg snoRNA o zróżnicowanym poziomie, a immunoprecypitacja tego białka potwierdziła jego wiązanie z cząsteczkami snoRNA, co popiera wcześniejsze doniesienia o jego wiązaniu z intronami [238, 292]. Z tego względu, aby ocenić znaczenie białka FUS w biogenezie sdrRNA, oceniono poziom wybranych sdrRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w linii komórkowej U-87 MG, która została pozbawiona genu *fus* z użyciem techniki CRISPR/Cas9 [238]. Klony z delecją białka FUS zostały pozyskane dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu kierowanego przez dr hab. Dorotę Raczyńską, prof. UAM. W komórkach pozbawionych białka FUS nie odnotowano różnic w poziomie cząsteczek sdrRNA (Ryc. 24 A-B). W przypadku ich prekursorowych snoRNA, zaobserwowano, iż poziom SNORA77 wzrósł prawie 2-krotnie, a poziom SNORA81 obniżył się o 35 %. (Ryc. 24 A-B).



Rycina 24. Ocena poziomu wybranych sdrRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w komórkach pozbawionych białka FUS. A-B. Względny poziom wybranych cząsteczek sdrRNA i snoRNA w linii komórkowej U-87 MG pozbawionej genu *fus*. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do komórek kontrolnych typu dzikiego. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4.2. Ocena poziomu wybranych sdRNA i snoRNA w komórkach GBM ze zwiększonym poziomem białka FUS

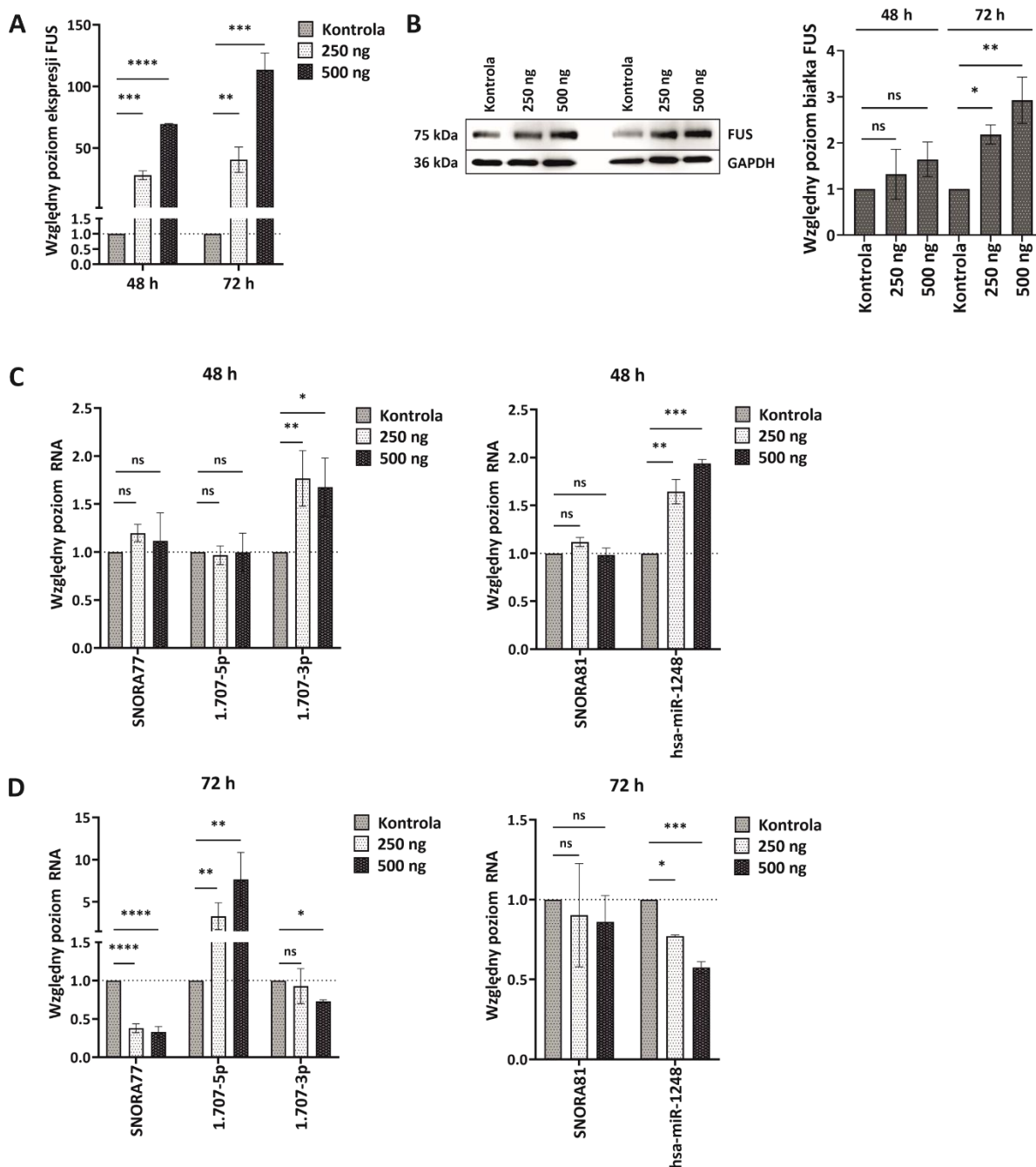
W celu dalszej oceny wpływu białka FUS na poziom wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA, wykonano eksperyment typu „nabycie funkcji”. W tym celu użyto wektora do nadekspresji genu *fus*, uzyskanego dzięki uprzejmości Zakładu Ekspresji Genów Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu kierowanego przez dr hab. Dorotę Raczyńską, prof. UAM. Aby wyniki były spójne z analizą poziomu wybranych cząsteczek po delecji genu *FUS*, prócz linii komórkowych U-251 MG oraz U-118 MG, eksperyment został wykonany również na linii U-87 MG. Komórki zostały poddane transfekcji plazmidem ekspresyjnym FUS o stężeniu 250 ng oraz 500 ng i zebrane w celu izolacji całkowitego RNA i białka w dwóch punktach czasowych: po 48 h i po 72 h.

W pierwszej kolejności, w celu oceny poprawności wykonanego eksperymentu, ocenę poddano poziom zarówno transkryptu jak i białka FUS. Wyniki potwierdziły znaczny wzrost ekspresji mRNA FUS już po 48 h od transfekcji, nawet ponad 100-krotny w linii U-251 MG po 72 h (Ryc. 25 A), czy prawie 60-krotny w linii U-118 MG po 72 h (Ryc. 26 A). Najniższy wzrost poziomu ekspresji FUS po 72 h odnotowano w linii U-87 MG (około 20-krotny) (Ryc. 27 A). We wszystkich badanych liniach komórkowych, wzrost poziomu białka został zaobserwowany po 72 h od transfekcji. Najwyższy wzrost poziomu białka odnotowano w linii komórkowej U-87 MG przy stężeniu plazmidu 500 ng (ponad 7,5-krotny wzrost w porównaniu do kontroli) (Ryc. 27 C), w linii U-251 MG natomiast poziom białka wzrósł 2-krotnie przy stężeniu 250 ng i prawie 3-krotnie przy stężeniu 500 ng (Ryc. 25 B), a w linii U-118 MG wzrósł ponad 2-krotnie przy stężeniu 500 ng (Ryc. 26 B).

Kolejno ocenie został poddany poziom wybranych cząsteczek sdRNA oraz snoRNA. Po 48 h, zaobserwowano ponad 1,5-krotny wzrost poziomu cząsteczek 1_707-3p oraz hsa-miR-1248 w linii komórkowej U-251 MG zarówno przy stężeniu plazmidu 250 ng, jak i 500 ng (Ryc. 25 C). Podobną tendencję odnotowano dla tych cząsteczek w pozostałych liniach komórkowych U-118 MG oraz U-87 MG, jednakże dla cząsteczki hsa-miR-1248 wzrost zaobserwowano jedynie przy stężeniu plazmidu równym 500 ng (Ryc. 26 C, 16 C). W przypadku prekursorowych snoRNA, w linii U-87 MG poziom cząsteczki SNORA77 uległ obniżeniu o 35 % w porównaniu do kontroli (Ryc. 27 C). Nie odnotowano zmian w poziomie cząsteczek 1_707-5p oraz SNORA81 po 48 h (Ryc. 25 C, 26 C, 27 C). Po 72 h, poziom cząsteczki 1_707-5p wzrósł we wszystkich badanych liniach komórkowych wprost

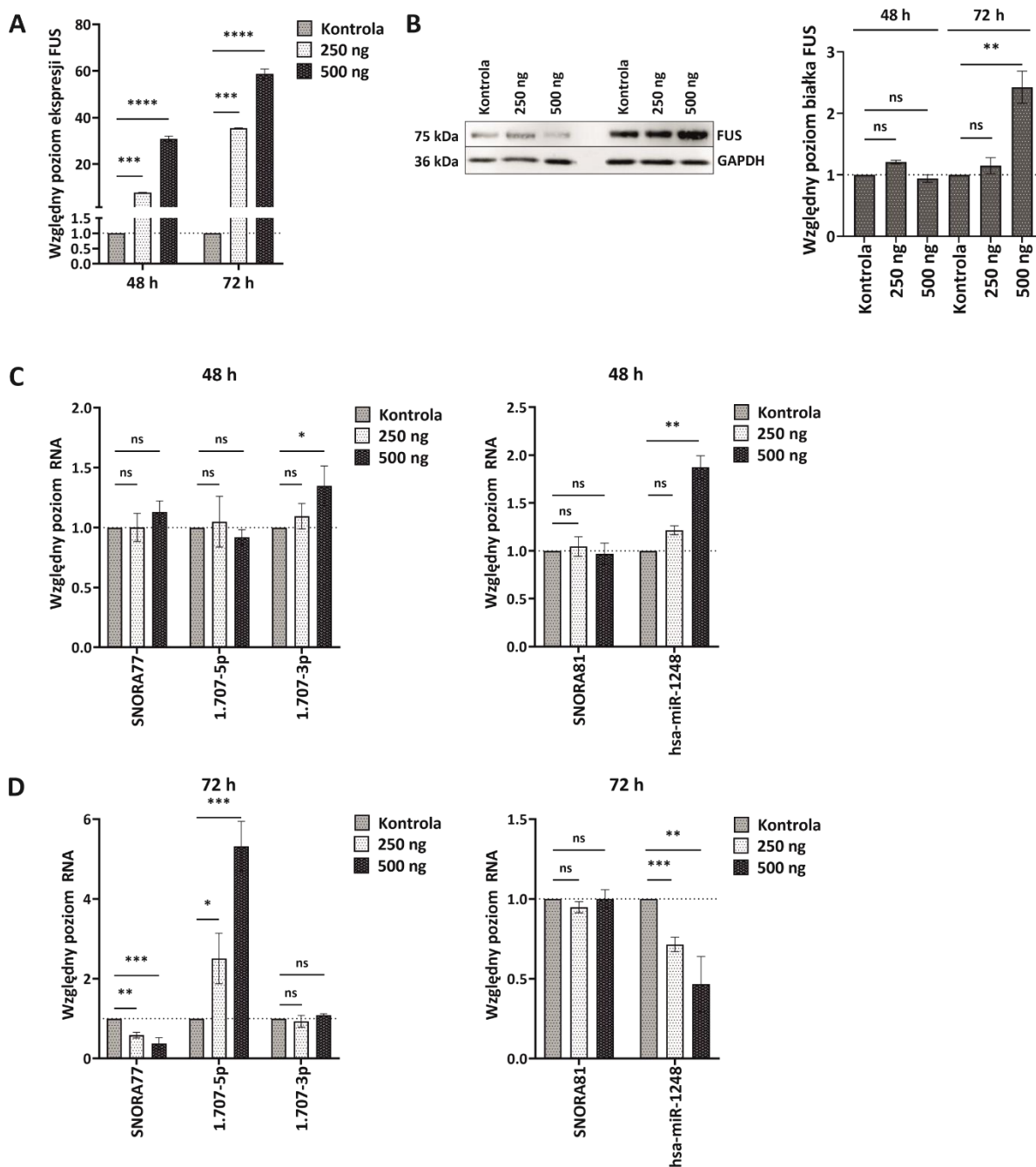
proporcjonalnie do stężenia plazmidu do nadekspresji *fus*. Najwyższy wzrost, bo ponad 7,5-krotny zaobserwowano w linii komórkowej U-251 MG przy stężeniu plazmidu równym 500 ng. Po tym samym czasie, dla cząsteczek hsa-miR-1248 oraz SNORA77 odnotowano znaczne obniżenie poziomu w porównaniu do kontroli we wszystkich badanych liniach komórkowych. We wszystkich badanych liniach, poziom cząsteczki hsa-miR-1248 uległ obniżeniu średnio o około 25 % przy stężeniu plazmidu równym 250 ng i średnio i o około 45 % przy stężeniu plazmidu równym 500 ng. W przypadku SNORA77, zaobserwowano nawet 80 % obniżenie poziomu tej cząsteczki w linii komórkowej U-87 MG przy stężeniu plazmidu równym 500 ng. W pozostałych liniach, jej poziom malał odwrotnie proporcjonalnie do stężenia plazmidu o średnio 40 – 70 %. W przypadku cząsteczki sdRNA 1_707-3p odnotowano 30 % spadek poziomu w linii komórkowej U-251 MG przy stężeniu plazmidu równym 500 ng, natomiast dla SNORA81 nie odnotowano zmian w jej poziomie po 72 h od transfekcji (Ryc. 25 D, 26 D, 27 D). Warto wspomnieć, że analiza poziomu dla cząsteczki SNORA77 jest spójna z wynikami uzyskanymi w linii komórkowej U-87 MG z delecją genu *fus*, gdzie jej poziom wzrósł prawie 2-krotnie (Ryc. 24 A).

U-251 MG



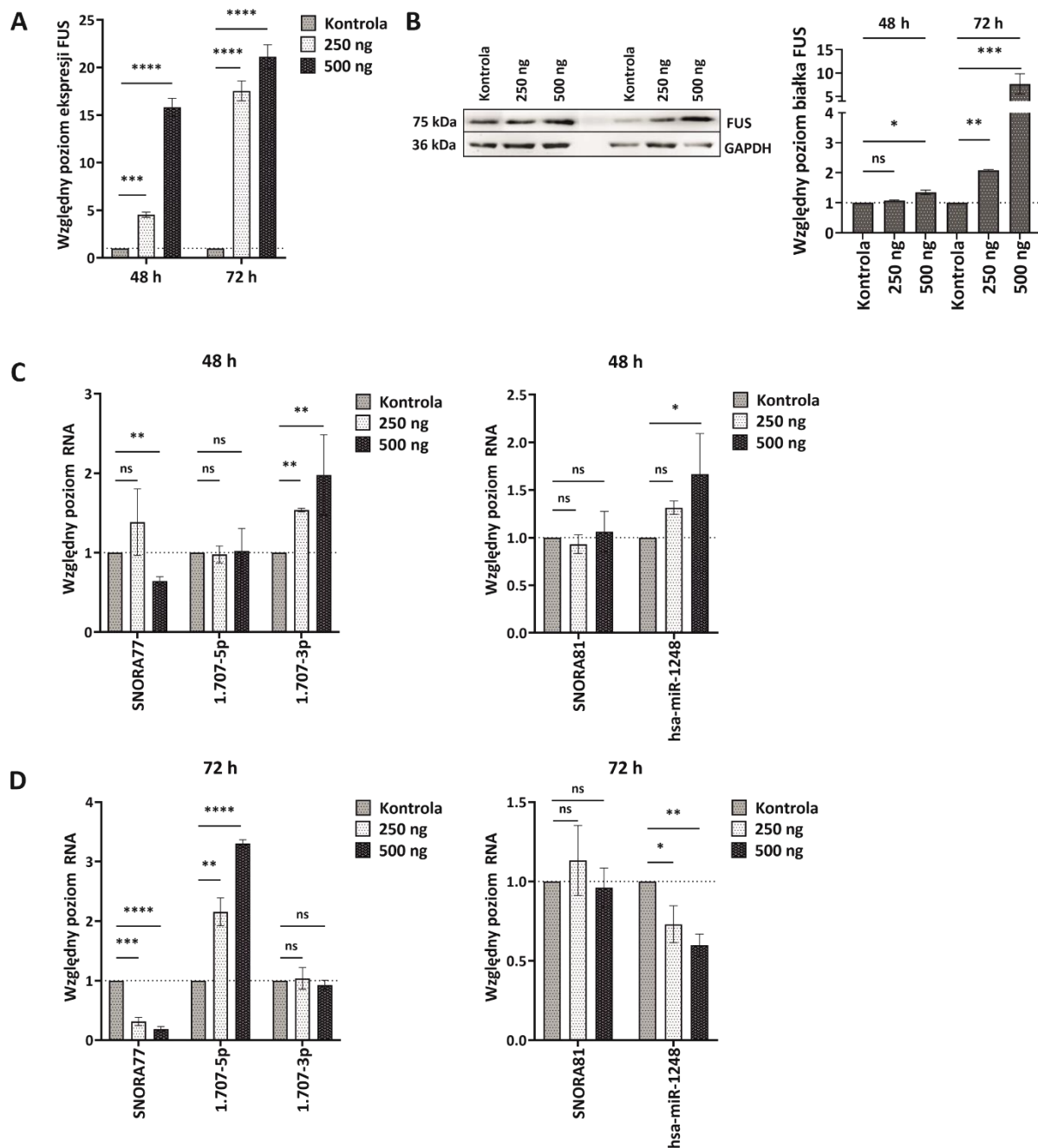
Rycina 25. Analiza poziomu wybranych sRNA i snoRNA w linii komórkowej U-251 MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. A. Względny poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **B.** Względny poziom białka FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **C-D.** Względny poziom wybranych cząsteczek sRNA i snoRNA po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do nietraktowanych wektorem komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

U-118 MG



Rycina 26. Analiza poziomu wybranych sRNA i snoRNA w linii komórkowej U-118 MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. A. Względny poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **B.** Względny poziom białka FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **C-D.** Względny poziom wybranych cząsteczek sRNA i snoRNA po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do nietraktowanych wektorem komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

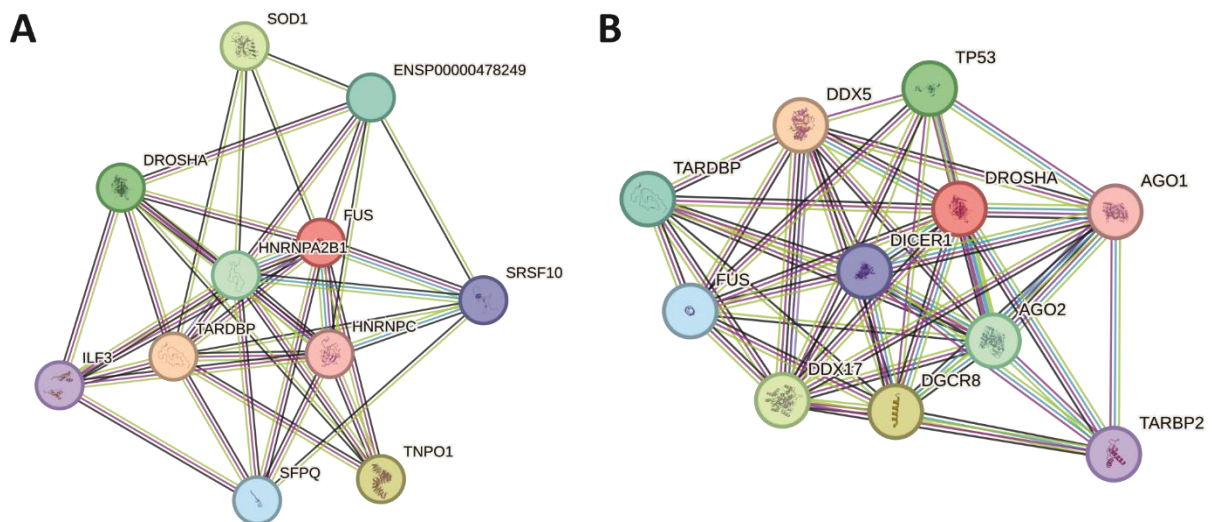
U-87 MG



Rycina 27. Analiza poziomu wybranych sRNA i snoRNA w linii komórkowej U-87 MG ze zwiększonym poziomem białka FUS. **A.** Względny poziom ekspresji transkryptu FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **B.** Względny poziom białka FUS po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. **C-D.** Względny poziom wybranych cząsteczek sRNA i snoRNA po transfekcji wektorem ekspresyjnym po 48 h i 72 h. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do nietraktowanych wektorem komórek kontrolnych. Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4.3. Analiza *in silico* miejsc wiązania snoRNA oraz sdRNA z wybranymi białkami

Dowiedziano, że białko FUS ma wpływ na poziom snoRNA, a także może brać udział w biogenezie miRNA poprzez wiązanie do chromatyny w miejscach transkrypcji ich prekursorów. Co więcej, w komórkach z obniżonym poziomem FUS, odnotowano również obniżony poziom DROSHA, co sugeruje, że białko FUS może być wymagane do rekrutacji DROSHA w określonych loci pri-miRNA [238, 239]. Biorąc pod uwagę te doniesienia oraz wcześniejsze wyniki potwierdzające zróżnicowany poziom zarówno sdRNA i snoRNA po manipulacji poziomem białka FUS, aby dokładniej zidentyfikować interakcje między białkiem FUS a DROSHA i ich udział w powstawaniu sdRNA, w pierwszej kolejności z użyciem narzędzia STRING wygenerowano sieci interakcji dla obydwu białek, które zostały przedstawione na Rycinie 28. Wykonana analiza *in silico* potwierdziła wiązanie pomiędzy białkiem FUS a DROSHA. Białko FUS wiąże się również z takimi białkami jak SRSF10, SOD1, HNRNPC, HNRNPA2B1, TNPO1, TARDBP, ILF3, SFPQ. Białko DROSHA natomiast wykazuje miejsca wiązania z P53, AGO1, AGO2, DGCR8, DICER1, DDX5, DDX17, TARBP2 (Ryc. 28).



Rycina 28. Sieć interakcji białek powiązanych z białkiem FUS (A) i białkiem DROSHA (B). Linia fioletowa – potwierdzone eksperymentalnie interakcje między białkami, linia niebieska – potwierdzone interakcje między białkami na podstawie baz danych, linia zielona – przewidywane interakcje między białkami na podstawie danych literaturowych, linia czarna – przewidywane interakcje między białkami na podstawie współwystępowania białek.

Białka biorące potencjalnie udział w przetwarzaniu snoRNA na krótsze sdrRNA, powinny posiadać miejsca wiązania z prekursorowymi cząsteczkami snoRNA. W celu identyfikacji białek jądrowych mogących potencjalnie wpływać na biogenezę sdrRNA, korzystając z bazy danych CLIPdb, przeprowadzono analizę *in silico* w poszukiwaniu potencjalnych miejsc wiązania. Analiza została przeprowadzona dla wszystkich białek wykazujących interakcje zarówno z białkiem FUS, jak i białkiem DROSHA a prekursorowymi SNORA77 i SNORA81. Jednocześnie, w celu oceny potencjalnych funkcji sdrRNA, z wykorzystaniem bazy danych miRTarBase oceniono potencjalne miejsca wiązania między poszczególnymi białkami a cząsteczkami miRNA. Zarówno CLIPdb, jak i miRTarBase korzystają z danych z sekwencjonowania RNA po zastosowaniu immunoprecypitacji z „cross-linking”. Z uwagi na ograniczone możliwości bazy danych miRTarBase i brak możliwości oceny potencjalnych miejsc wiązania dla badanych w niniejszej pracy cząsteczek sdrRNA 1_707-5p oraz 1_707-3p, analizie została poddana jedynie cząsteczka hsa-miR-1248. Wyniki analiz dla cząsteczek SNORA77, SNORA81 oraz hsa-miR-1248 przedstawione zostały w Tabeli 42. Analiza wykazała, że SNORA77 posiada miejsca wiązania dla białek HNRNPC, TARDBP oraz AGO2, z czego najwięcej doniesień (44) dotyczy białka AGO2. Z kolei SNORA81 posiada miejsca wiązania z białkami FUS, SRSF10, HNRNPC, TARDBP, AGO2, DGCR8, TARBP2. Podobnie jak w przypadku SNORA77, cząsteczka SNORA81 wykazuje największą liczbę notowań dla białka AGO2 (85). Wiązania między wybranymi białkami a cząsteczką hsa-miR-1248 nie zostały potwierdzone w eksperymencie immunoprecypitacji z „cross-linking” (Tabela 42).

Tabela 42. Analiza miejsc wiązania pomiędzy białkami wchodzącymi w interakcje z białkami FUS i DROSHA a cząsteczkami SNORA77, SNORA81 oraz hsa-miR-1248.

Nazwa białka	SNORA77		SNORA81		hsa-miR-1248	
	Baza danych CLIPdb	Liczba doniesień	Baza danych CLIPdb	Liczba doniesień	Baza danych miRTarBase	Liczba doniesień
FUS	Nie	-	Tak	3	Nie	-
DROSHA	Nie	-	Nie	-	Nie	-
Białka wchodzące w interakcje z FUS						
SRSF10	Nie	-	Tak	3	Nie	-
SOD1	Brak danych		Brak danych		Brak danych	
HNRNPC	Tak	1	Tak	34	Nie	-
HNRNPA2B1	Nie	-	Nie	-	Nie	-
TNPO1	Brak danych		Brak danych		Nie	-

TARDBP	Tak 7	Tak 27	Nie -
ILF3	Nie -	Nie -	Brak danych
SFPQ	Brak danych	Brak danych	Nie -
Białka wchodzące w interakcje z DROSHA			
P53	Brak danych	Brak danych	Nie -
AGO1	Brak danych	Brak danych	Nie -
AGO2	Tak 44	Tak 85	Nie -
DGCR8	Nie -	Tak 2	Brak danych
DICER1	Nie -	Nie -	Nie -
DDX5	Brak danych	Brak danych	Nie -
DDX17	Brak danych	Brak danych	Nie -
TARBP2	Nie -	Tak 2	Nie -

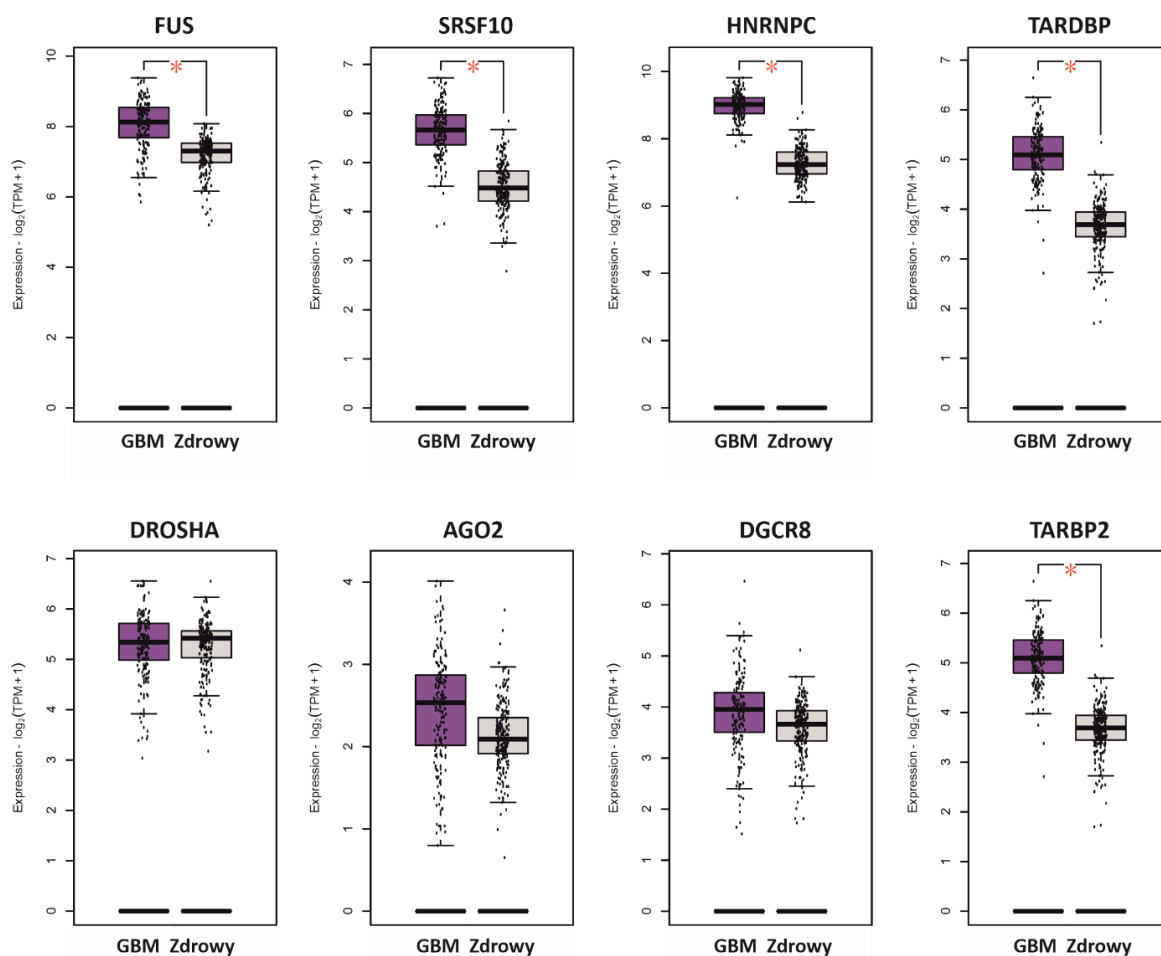
4.4.4. Charakterystyka białek potencjalnie wiążących badane snoRNA

W kolejnym kroku, w celu identyfikacji potencjalnej zależności między wybranymi SNORA77, SNORA81 a białkami wiążącymi oraz domniemanej funkcji wymienionych snoRNA, do dalszych analiz wybrano te białka, które wykazały miejsce wiązania dla co najmniej jednej z analizowanych snoRNA. Mimo, że analiza *in silico* wiązań z wybranymi białkami a snoRNA i hsa-miR-1248 nie potwierdziła ich wiązania z DROSHA, białko to zostało wzięte pod uwagę w dalszej części badań ze względu na opisaną wcześniej potencjalne interakcje z białkiem FUS. Znane funkcje wybranych białek przedstawione zostały w Tabeli 43. Wszystkie wybrane białka zostały opisane jako białka wiążące RNA, a większość z nich z wyjątkiem składowych mikroprocesora (DROSHA, DGCR8), bierze klasycznym bądź alternatywnym splicingu. Dodatkowo białka te biorą udział w takich procesach jak transport RNA, czy mają wpływ na jego stabilność (Tab. 43).

Tabela 43. Funkcje wybranych białek wiążących SNORA77 i SNORA81. Funkcje wybranych białek na podstawie bazy danych The Human Protein Atlas (<https://www.proteinatlas.org/>).

Nazwa białka	Funkcja
FUS	Składnik jądrowego kompleksu rybonukleoprotein (hnRNP). Białko wiążące DNA/RNA, odgrywa rolę w różnych procesach komórkowych, takich jak regulacja transkrypcji, splicing pre-mRNA, transport RNA do cytoplazmy, naprawa DNA i odpowiedź na uszkodzenia. W neuronach odgrywa kluczową rolę w tworzeniu kolców dendrytycznych i zachowanie homeostazy synaptycznej.
DROSHA	Składnik kompleksu mikroprocesorowego wraz z DGCR8. Rybonukleaza (RNaza) III specyficzna dla RNA, która katalizuje specyficzne cięcie pri-miRNA w celu uwolnienia pre-miRNA w kształcie spinki do włosów, które są następnie cięte w cytoplazmie przez DICER w celu powstania dojrzałych miRNA.
Białka wchodzące w interakcje z FUS	
SRSF10	Działa jako represor splicingu pre-mRNA, bierze udział w regulacji alternatywnego splicingu w neuronach, przy czym izoforma 1 działa jako wzmacniacz a izoforma 3 jako wyciszacz.
HNRNPC	Wiąże pre-mRNA i pośrednio bierze udział w regulacji splicingu, zapoczątkowuje wiązanie podjednostek 40S kompleksu rybonukleoprotein (hnRNP). Oddziałując z poli-U w 3'-UTR lub 5'-UTR mRNA moduluje stabilność i poziom translacji związanych cząsteczek mRNA.
TARDBP	Wiążąc RNA, reguluje biogenezę i przetrwanie mRNA oraz splicing zarówno niekodujących, jak i kodujących białka RNA, w tym białek biorących udział w przeżyciu neuronów.
Białka wchodzące w interakcje z DROSHA	
AGO2	W cytoplazmie składnik kompleksu wyciszającego indukowanego RNA (RISC, ang. <i>RNA-induced silencing complex</i>). Bierze udział w procesie interferencji RNA (RNAi) oraz hamuje inicjację translacji poprzez wiązanie z czapeczką mRNA czy interakcje z białkiem EIF6. W jądrze reguluje splicing i ułatwia eksport jądrowy mRNA [231].
DGCR8	Składnik kompleksu mikroprocesorowego wraz z DROSHA pełniący rolę białka wiążącego RNA i biorący udział w początkowym etapie biogenezy miRNA. W kompleksie DGCR8 pełni funkcję kotwicy molekularnej niezbędnej do rozpoznawania pri-miRNA na połączeniu i kieruje DROSHA do katalitycznego cięcia.
TARBP2	W cytoplazmie wymagany do tworzenia kompleksu RISC, wymagany do przetworzenia pre-miRNA i następnie załadownia ich na AGO2. W jądrze wpływa na stabilność RNA, wiążąc się z pre-mRNA powoduje retencję intronów prowadząc do degradacji transkryptów związanych z TARBP2 [293].

Następnie określono poziom transkryptów wybranych białek w tkankach GBM w porównaniu do zdrowej kontroli korzystając z serwera GEPIA2, bazującego na danych z sekwencjonowania RNA z projektu TCGA. Najwyższy poziom ekspresji w GBM zaobserwowano dla HNRNPC, najniższy natomiast dla AGO2. Jednocześnie, TARDBP i TARBP2 wykazały największy wzrost poziomu ekspresji w porównaniu do zdrowej kontroli (około 1,5-krotnie wyższy) (Ryc. 29).

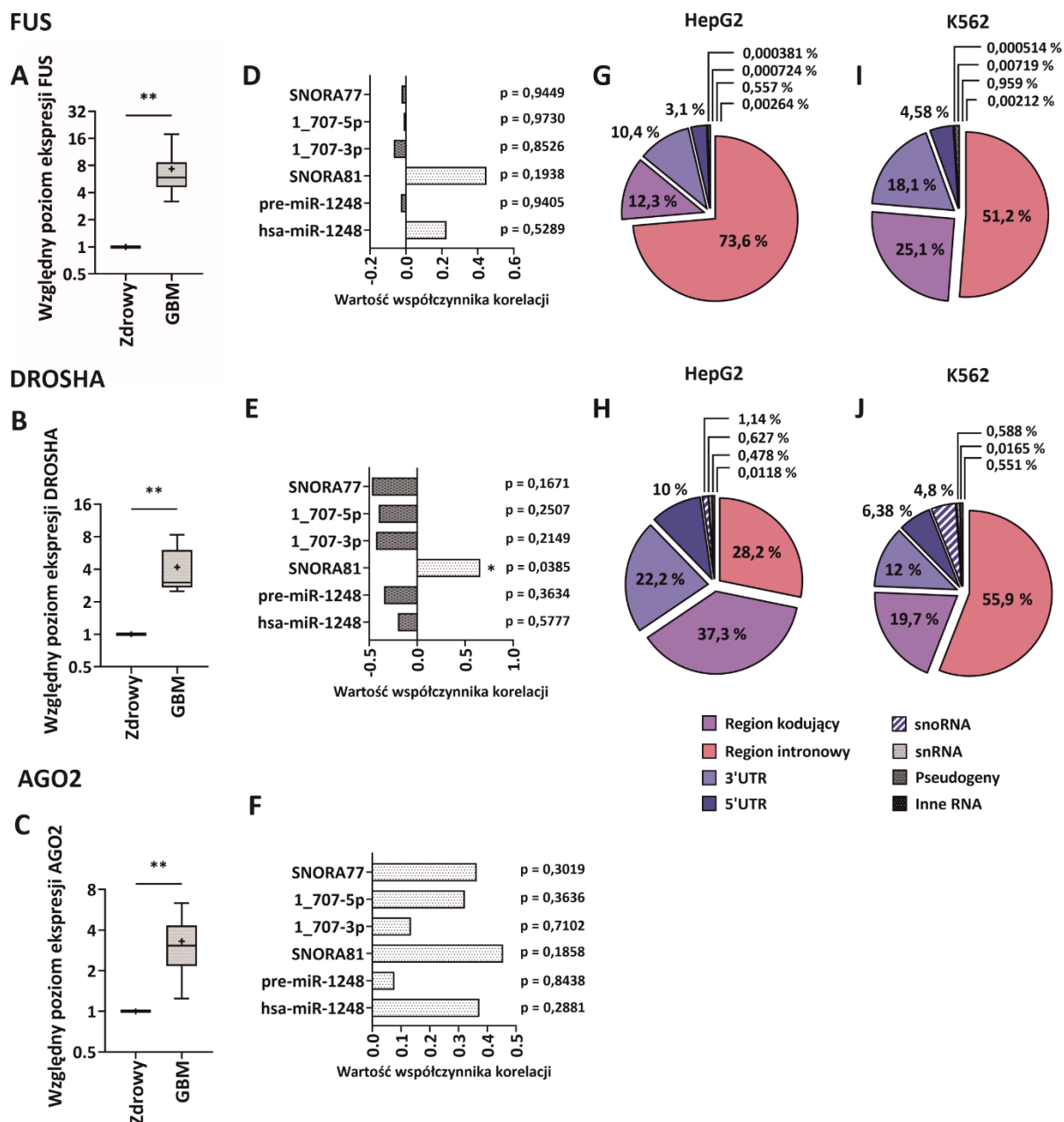


Rycina 29. Poziom ekspresji wybranych transkryptów białek wiążących SNORA77 i SNORA81 w GBM. Górny panel przedstawia poziom transkryptu FUS w GBM oraz transkryptów białek z nim wiążących, dolny panel przedstawia poziom transkryptu DROSHA w GBM oraz transkryptów białek z nim wiążących.

4.4.5. Ocena zależności między transkryptami wybranych białek a cząsteczkami snoRNA i sdrRNA

W celu określenia potencjalnej biogenezy cząsteczek sdrRNA do dalszych analiz wybrano białka FUS oraz DROSHA. Dodatkowo, aby zbadać potencjalną funkcję sdrRNA, a także ich prekursorów w jądrze, ze względu na największą liczbę potwierdzonych eksperymentalnie doniesień na wiązanie SNORA77 i SNORA81, wybrano również białko AGO2. W pierwszej kolejności oceniono poziom transkryptów wybranych białek w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. W badaniu wykorzystano te same tkanki, które zostały użyte do walidacji wybranych cząsteczek sdrRNA oraz snoRNA. Wszystkie transkrypty wykazały podwyższony poziom ekspresji w porównaniu do kontroli zdrowego mózgu: zidentyfikowano ponad 7-krotnie wyższy poziom ekspresji FUS oraz prawie

4-krotnie wyższe poziomy ekspresji DROSHA i AGO2 (Ryc. 30 A-C). Kolejno oceniono korelację między poziomem ekspresji transkryptów wybranych białek a badanymi w niniejszej pracy cząsteczkami snoRNA i sdrRNA, co potencjalnie mogłoby wyjaśnić potencjalne mechanizmy powstawania i funkcje sdrRNA. Zaobserwowano istotnie statystyczną silną pozytywną korelację między transkrypcją białka DROSHA a SNORA81 (wartość współczynnika korelacji „r” = 0,6583). Pozostałe cząsteczki nie wykazały istotnej statystycznie korelacji zarówno z transkryptami białek FUS, DROSHA, jak i AGO2 (Ryc. 30 D-F). Dodatkowo wykonano analizę procentową udziału różnych regionów i rodzajów RNA w wiązaniu z wybranymi białkami, korzystając z bazy danych EuRBPDB. Ze względu na ograniczoną liczbę danych w bazie, uzyskane wyniki dotyczyły białek FUS oraz DROSHA w liniach komórkowych raka wątroby (HepG2) i białaczki szpikowej (K562). W przypadku białka FUS, najwięcej wiązań odnotowano z regionem intronowym (73,6 % w linii komórkowej HepG2 i 51,2 % w linii komórkowej K562). SnoRNA nie obejmowały nawet 1 % ze wszystkich analizowanych regionów i rodzajów RNA (Ryc. 30 G, 19 I). Dla białka DROSHA natomiast w linii komórkowej HepG2 najwięcej wiązań odnotowano z regionem kodującym, a w linii komórkowej K562 z regionem intronowym. Cząsteczki snoRNA w linii komórkowej HepG2 obejmowały jedynie 1,14 %, a w linii komórkowej K562 niecałe 5 % (Ryc. 30 I, 30 J).



Rycina 30. Ocena korelacji między białkami FUS, DROSHA i AGO2 a wybranymi snoRNA i sdRNA oraz analiza procentowa udziału różnych regionów i rodzajów RNA w wiązaniu z białkami FUS i DROSHA. A-C. Względny poziom ekspresji transkryptów białek FUS (A), DROSHA (B) i AGO2 (C) w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SEM, znormalizowano względem genów referencyjnych i przyrównano do RNA pochodzącego ze zdrowego mózgu. Na wykresie, linia na kolumnie reprezentuje medianę, natomiast znak „+” średnią wartość. D-F. Współczynnik korelacji Pearsona między transkryptami białek FUS (D), DROSHA (E) i AGO2 (F) a wybranymi snoRNA i sdRNA. G-J. Analiza procentowa udziału różnych regionów i rodzajów RNA w wiązaniu z białkami FUS w linii komórkowej HepG2 (G) i K562 (I) oraz DROSHA w linii komórkowej HepG2 (H) i K562 (J). Istotność statystyczna obliczona za pomocą testu T Studenta dla prób niezależnych: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$ brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4.6. Ocena wiązania cząsteczek snoRNA oraz sdRNA z wybranymi białkami za pomocą metody immunoprecypitacji

W celu oceny interakcji wybranych cząsteczek snoRNA oraz sdRNA z wybranymi białkami, przeprowadzono eksperyment immunoprecypitacji z wykorzystaniem „cross-linking” (CLIP, ang. *cross-linking immunoprecipitation*). Porównanie metod immunoprecypitacji z oraz bez „cross-linking” (IP, ang. *immunoprecipitation*) zostało zamieszczone w Tabeli 44. W niniejszej pracy wybrano metodę immunoprecypitacji z „cross-linking” ze względu na poszukiwanie zarówno potencjalnych funkcji sdRNA i snoRNA (detekcja trwałych wiązań), jak i sposobu powstawania sdRNA (detekcja zarówno trwałych, jak i słabych i chwilowych wiązań).

Tabela 44. Porównanie metod immunoprecypitacji z i bez „cross-linking”. Opracowano na podstawie [294, 295].

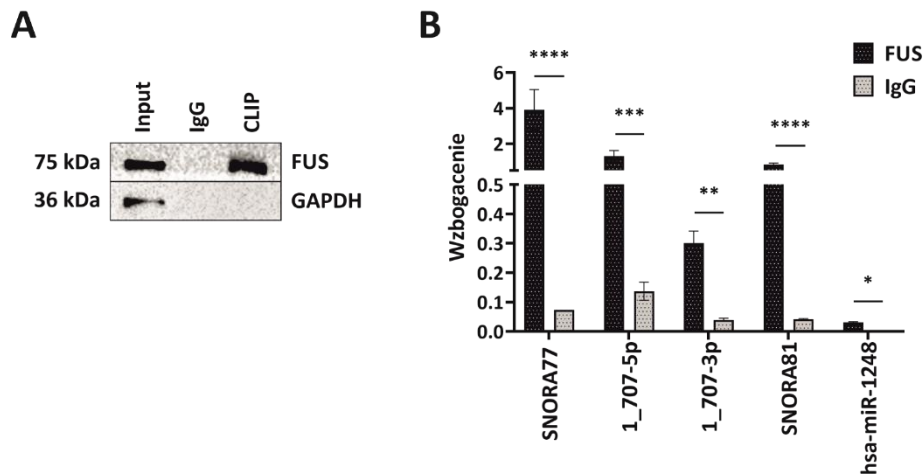
Immunoprecypitacja z „cross-linking” (CLIP)	Immunoprecypitacja bez „cross-linking” (IP)
Możliwość detekcji zarówno trwałych, słabych jak i chwilowych wiązań RNA-białko	Możliwość detekcji jedynie trwałych wiązań RNA-białko
Bezpośrednie wiązania RNA-białko	Bezpośrednie i pośrednie wiązania RNA-białko
Bardziej specyficzne	Mniej specyficzne
Mogą występować artefakty	Brak artefaktów

4.4.6.1. Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA z białkiem FUS

W niniejszej pracy wykazano, że delecja genu *FUS* wpływa na zmniejszenie poziomu cząsteczki SNORA77 oraz podwyższenie poziomu cząsteczki SNORA81. Ponadto, przy podwyższeniu poziomu tego białka zaobserwowano wzrost poziomu sdRNA 1_707-5p oraz spadek poziomu hsa-miR-1248 i SNORA77. Aby potwierdzić bądź wykluczyć wiązanie między wybranymi cząsteczkami snoRNA i sdRNA, przeprowadzono eksperyment CLIP białka FUS w linii komórkowej U-251 MG. Poprawność wykonanego eksperymentu została potwierdzona przy użyciu metody Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko FUS. Potwierdzono jego obecność w lizacie komórkowym (Input) oraz próbie po

immunoprecypitacji białka FUS (CLIP) i wykluczono w kontroli negatywnej z przeciwciałem skierowanym przeciwko IgG (IgG) (Ryc. 31 A).

Kolejną ocenę poddano obecność wybranych snoRNA i sdRNA w próbce po immunoprecypitacji białka FUS oraz kontroli negatywnej (IgG). W próbce po immunoprecypitacji białka FUS odnotowano podwyższony poziom wszystkich badanych snoRNA i sdRNA w porównaniu do kontroli. Najwyższy poziom zaobserwowano dla cząsteczki SNORA77 (wzbogacenie = 3,92) oraz niższy dla cząsteczek 1_707-5p (wzbogacenie = 1,31), SNORA81 (wzbogacenie = 0,84), 1_707-3p (wzbogacenie = 0,3), hsa-miR-1248 (wzbogacenie = 0,03) (Ryc. 31 B).

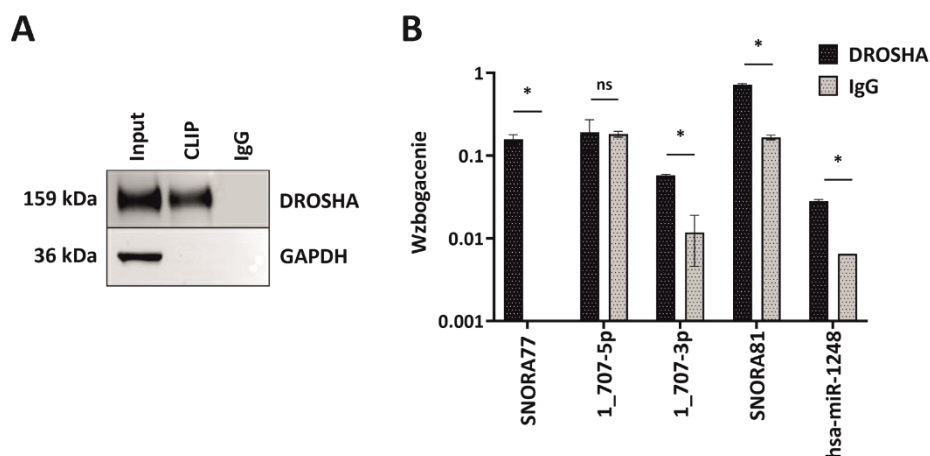


Rycina 31. Analiza wiązania wybranych snoRNA i sdRNA przez białko FUS. **A.** Western Blot potwierdzający poprawność wykonania eksperymentu CLIP na białko FUS w linii komórkowej U-251 MG. **B.** Bezwzględna liczba wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA we frakcji po eksperymencie CLIP na białko FUS i w kontroli negatywnej (IgG). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4.6.2. Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA oraz sdRNA z białkiem DROSHA

Kolejno, w celu potwierdzenia bądź wykluczenia wiązania między wybranymi cząsteczkami snoRNA i sdRNA a białkiem DROSHA, przeprowadzono eksperyment CLIP tego białka w linii komórkowej U-251 MG. W pierwszej kolejności ocenie poddano poprawność wykonania eksperymentu przy użyciu metody Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko DROSHA. Obecność tego białka została potwierdzona w lizacie komórkowym (Input) oraz próbce po immunoprecypitacji białka DROSHA (CLIP) i wykluczona w kontroli negatywnej z przeciwciałem skierowanym przeciwko IgG (IgG) (Ryc. 32 A).

Następnie oceniono obecność wybranych snoRNA i sdRNA w próbce po immunoprecypitacji białka DROSHA oraz kontroli negatywnej (IgG). W próbce po immunoprecypitacji białka DROSHA zaobserwowano podwyższony poziom badanych snoRNA SNORA77 i SNORA81 oraz sdRNA 1_707-3p i hsa-miR-1248 w porównaniu do kontroli. Najwyższy poziom zaobserwowano dla cząsteczki SNORA81 (wzbogacenie = 0,72) oraz zdecydowanie niższy dla cząsteczek SNORA77 (wzbogacenie = 0,15), 1_707-3p (wzbogacenie = 0,06) i hsa-miR-1248 (wzbogacenie = 0,03). W przypadku sdRNA 1_707-5p nie odnotowano wiązania pomiędzy tą cząsteczką a badanym białkiem (Ryc. 32 B).

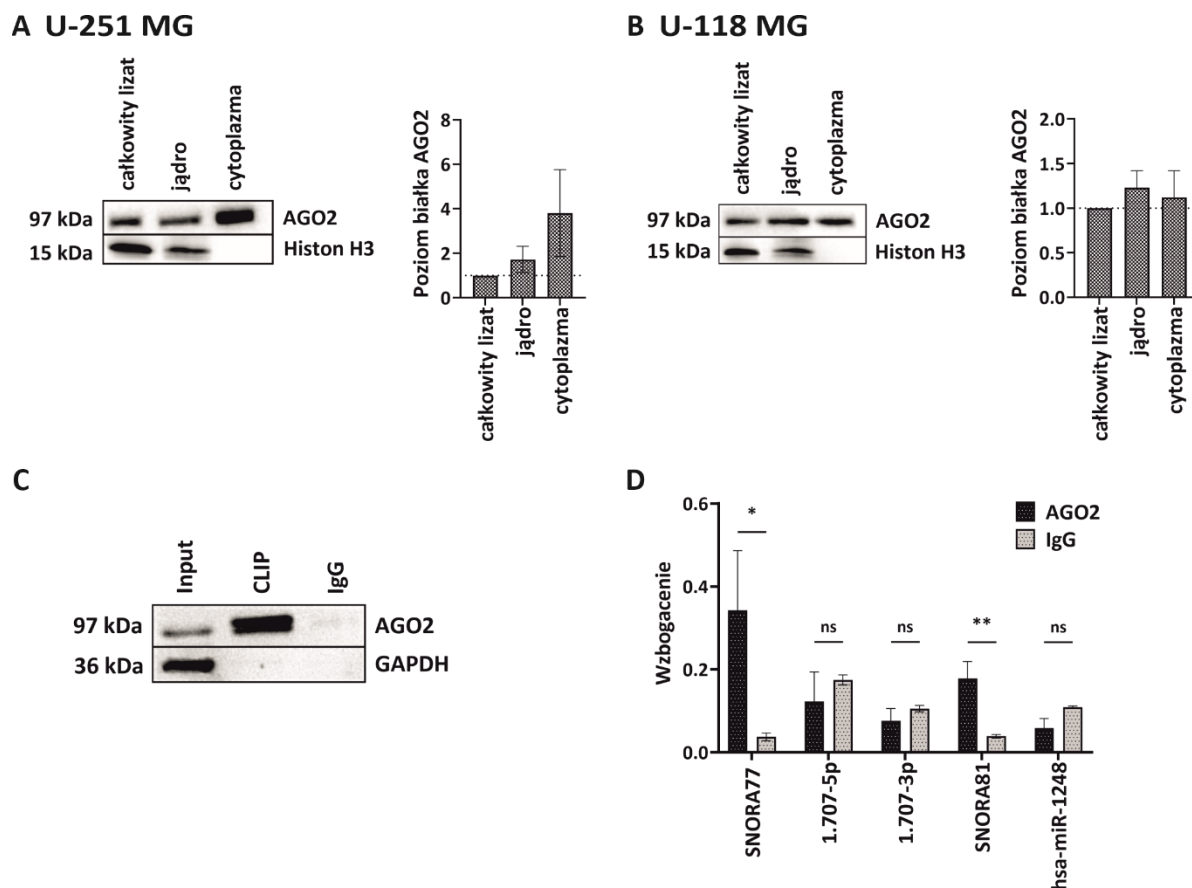


Rycina 32. Analiza wiązania wybranych snoRNA i sdRNA przez białko DROSHA. A. Western Blot potwierdzający poprawność wykonania eksperymentu CLIP na białko DROSHA w linii komórkowej U-251 MG. B. Bezwzględna liczba wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA we frakcji po eksperymencie CLIP na białko DROSHA i w kontroli negatywnej (IgG). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

4.4.6.3. Ocena wiązania wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA z białkiem AGO2

Analizy *in silico* dotyczące wiązań między wybranymi cząsteczkami a białkami, wykazały, że cząsteczki SNORA77 i SNORA81 posiadają najwięcej potwierdzonych eksperymentalnie wiązań z białkiem AGO2. W związku z brakiem doniesień literaturowych dotyczących kolokalizacji białka AGO2 w GBM, w pierwszej kolejności wykonano frakcjonowanie komórek GBM. Otrzymane wyniki Western Blot potwierdziły obecność białka AGO2 zarówno w cytoplazmie, jak i jądrze w obydwu liniach komórkowych U-251 MG i U-118 MG (Ryc. 33 A-B). Kolejno przeprowadzono eksperyment CLIP białka AGO2 w linii komórkowej U-251 MG w celu identyfikacji jego wiązania z wybranymi cząsteczkami snoRNA i sdRNA. Poprawność wykonanego eksperymentu została potwierdzona przy użyciu metody Western Blot z wykorzystaniem przeciwciała przeciwko AGO2. Obecność białka AGO2 została zaobserwowana w lizacie komórkowym (Input) oraz próbie po immunoprecypitacji białka AGO2 (CLIP) przy jednoczesnym jego braku w kontroli negatywnej (IgG) (Ryc. 33 C).

Eksperyment potwierdził wiązanie białka AGO2 z cząsteczkami SNORA77 (wzbogacenie = 0,34) i SNORA81 (wzbogacenie = 0,18), wykluczył natomiast jego wiązanie z cząsteczkami sdRNA (Ryc. 33 D).



Rycina 33. Analiza wiązania wybranych snoRNA i sdRNA przez białko AGO2. A-B. Western Blot potwierdzający obecność białka AGO2 zarówno w cytoplazmie jak i jądrze w linii komórkowej U-251 MG (A) i U-118 MG (B). C. Western Blot potwierdzający poprawność wykonania eksperymentu CLIP na białko AGO2 w linii komórkowej U-251 MG. D. Bezwzględna liczba wybranych cząsteczek snoRNA i sdRNA we frakcji po eksperymencie CLIP na białko AGO2 i w kontroli negatywnej (IgG). Wyniki przedstawiono jako średnie wartości \pm SD. Istotność statystyczna obliczona została za pomocą testu Two-Way ANOVA: ns – nieistotne statystycznie; * dla $p < 0,05$; ** dla $p < 0,01$; *** dla $p < 0,001$; **** dla $p < 0,0001$; brak istotności statystycznej (ns) dla $p \geq 0,05$.

Wyniki uzyskane w niniejszej pracy doktorskiej zostały podsumowane w Tabeli 45. Informacje w niej zawarte obejmują charakterystykę wybranych cząsteczek sdRNA (1_707-5p, 1_707-3p, hsa-miR-1248) oraz ich prekursorowych snoRNA (SNORA77, SNORA81), a także podsumowanie dotyczące korelacji wybranych cząsteczek, ich specyficzności występowania, lokalizacji, czy możliwości wiązania z wybranymi białkami.

Tabela 45. Podsumowanie wyników uzyskanych w ramach niniejszej rozprawy doktorskiej.

Legenda: korelacja z prekursorową snoRNA i „genami gospodarza”: ++ bardzo silna, + silna, - brak korelacji; tkankowo-zależna specyficzność: ↑ GBM: wyższy poziom w GBM, ↑↑ MRC-5: bardzo wysoki poziom w MRC-5, ↓ GBM: niższy poziom w GBM; lokalizacja jądrowa i związane z chromatyną: + tak, - nie; warunki hipoksji, delecja genu *fus*, zwiększony poziom białka FUS: ↑ podwyższony poziom, ↓ obniżony poziom, - brak zmian; korelacje z białkami FUS, DROSHA, AGO2: + silna, - brak korelacji; wiązanie z białkami FUS, DROSHA, AGO2: + potwierdzono eksperymentalnie, - nie potwierdzono eksperymentalnie.

	1_707-5p	1_707-3p	hsa-miR-1248	SNORA77	SNORA81
Korelacja z prekursorową snoRNA	++ pozytywna	+ pozytywna	-	Nie dotyczy	Nie dotyczy
Korelacja z „genami gospodarza”	Nie dotyczy	Nie dotyczy	Nie dotyczy	-	-
Tkankowo-zależna specyficzność	↑ GBM	↑ GBM	↑ GBM	↑ GBM ↑↑ MRC-5	↓ GBM
Lokalizacja jądrowa	+	+	+	+	+
Związane z chromatyną	+	+	+	+	+
Warunki hipoksji	↓	↓	↓	↑	↑
Fracja komórek macierzystych GBM	-	-	↑	-	↑
Delecja genu <i>fus</i>	-	-	-	↑	↓
Zwiększony poziom białka FUS	↑	-	↓	↓	-
Korelacja z białkiem FUS	-	-	-	-	-
Korelacja z białkiem DROSHA	-	-	-	-	+ pozytywna
Korelacja z białkiem AGO2	-	-	-	-	-
Wiązanie z białkiem FUS	+	+	+	+	+
Wiązanie z białkiem DROSHA	-	+	+	+	+
Wiązanie z białkiem AGO2	-	-	-	+	+

5. Dyskusja

5.1. Ocena sygnatury sdRNA oraz ich prekursorów w GBM

5.1.1. Zróżnicowany poziom sdRNA w GBM

W literaturze można znaleźć jedynie nieliczne doniesienia dotyczące profilu sdRNA w nowotworach, natomiast ciągle brakuje badań dotyczących ich profilu w GBM. Wysokoprzepustowa analiza sygnatury sdRNA obejmująca ponad 10 tysięcy pacjentów i 32 nowotwory, za wyjątkiem GBM, pozwoliła na rozróżnienie pacjentów z różnymi typami nowotworów, a także zidentyfikowanie poszczególnych podtypów w obrębie jednego nowotworu [251]. Badania dotyczące tkanek pochodzących od pacjentów z rakiem trzustki, również wykazały, że sdRNA charakteryzują się zróżnicowanym poziomem w tym nowotworze [250].

Poznanie sygnatury sdRNA w GBM, pozwoliłoby na lepsze zrozumienie mechanizmów stojących za procesem rozwoju i progresji tego nowotworu, co było jednym z głównych założeń niniejszej pracy. Analiza wyników sekwencjonowania RNA, będąca częścią tej rozprawy, wykazała, że sdRNA wykazują zróżnicowany poziom w GBM. Najwyższą sumaryczną liczbę odczytów w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, odnotowano dla cząsteczki hsa-miR-664a-3p. Cząsteczka ta wykazuje również wysoki poziom w raku wątrobowokomórkowym [296] czy raku żołądka, gdzie pełni rolę onkogenu [297].

Przeprowadzona w ramach pracy doktorskiej analiza poziomu wybranych sdRNA w tkankach pochodzących od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, potwierdziła obecność walidowanych cząsteczek w tym nowotworze. Jednocześnie, poziom wszystkich badanych cząsteczek sdRNA był wyższy w porównaniu do kontroli zdrowego mózgu. Najwyższy poziom ze wszystkich badanych cząsteczek odnotowano dla hsa-miR-1248. Inne zespoły badawcze również odnotowały jej wysoki poziom w GBM [244, 245], a także w glejaku o niskim stopniu złośliwości u dzieci [261] i raku prostaty [260]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy wykazały wysoki poziom w GBM również dla sdRNA 1_707-5p pochodzącego ze SNORA77. Badania dotyczące raka wątroby i różnych typów histologicznych raka nerki wykazały, że sdRNA pochodzące ze SNORA77 związane jest z rokowaniem wśród pacjentów, co sugeruje, że cząsteczka ta mogłaby być obiecującym markerem prognostycznym również w GBM [251].

5.1.2. Zróżnicowany poziom snoRNA w GBM

Liczne badania wykazały zależność między zmianami w poziomie snoRNA, a takimi procesami jak proliferacja, migracja, inwazja czy przeżywalność pacjentów [298]. W literaturze, większość opisanych snoRNA wykazuje wysoki poziom w nowotworach, pełniąc rolę onkogenów [205, 207, 209]. W GBM natomiast, zostały opisane dwie cząsteczki snoRNA: SNORD47 i SNORD76, charakteryzujące się niskim poziomem w tym nowotworze, pełniąc rolę supresorów poprzez hamowanie proliferacji i rozwoju komórek [198, 199].

W niniejszej pracy, jedyną cząsteczką wykazującą niższy poziom w GBM aniżeli w zdrowym mózgu jest SNORA77, co może wskazywać na jej supresorową funkcję w tym nowotworze, jednakże ta hipoteza wymaga dalszych badań. Jednocześnie jej wysoce zróżnicowany poziom pomiędzy tkankami może posłużyć w lepszym klasyfikowaniu pacjentów z GBM. W literaturze nie ma doniesień o tej cząsteczce w nowotworach, jednakże wykazuje ona podwyższony poziom u pacjentów z jaskrą [299]. SNORA77 jest prekursorem dla wspomnianej wcześniej cząsteczki 1_707-5p, dla której odnotowano wysoki poziom w GBM. Niski poziom SNORA77 może być efektem szybkiego jej przetwarzania na powstające z niej cząsteczki, co może wskazywać na funkcjonalność sdrRNA w procesie nowotworzenia.

W przeciwieństwie do SNORA77, pozostałe badane przeze mnie cząsteczki snoRNA cechował podwyższony poziom w GBM w odniesieniu do kontroli zdrowego mózgu. Te o najwyższym poziomie w tkankach GBM to cząsteczki SNORA36B, SNORA36A i SNORA60. W odróżnieniu od jej wysokiego poziomu w GBM, w raku płaskonabłonkowym głowy i szyi, SNORA36B została zidentyfikowana jako cząsteczka związana z dłuższą przeżywalnością wśród pacjentów [300]. W przypadku SNORA60 natomiast zaobserwowano, że wysoki poziom tej cząsteczki w chłoniaku rozlanym ma związek z niekorzystną prognozą wśród pacjentów [301]. Niewykluczone, że cząsteczki SNORA36B i SNORA60 mogą posłużyć również jako potencjalne markery prognostyczne w GBM. Hipoteza ta wymaga jednak zbadania ich poziomu na większej liczbie tkanek, a także w różnych stopniach złośliwości glejaka. W literaturze natomiast brakuje doniesień dotyczących poziomu SNORA36A czy jej potencjalnym wpływie onkogenezę, z tego względu może ona okazać się ciekawym obiektem badawczym.

Innymi badanymi w niniejszej pracy cząsteczkami o wysokim poziomie w GBM były SNORA38B, SNORA51 czy SNORA81. W literaturze można znaleźć doniesienia o ich wysokim poziomie również w innych typach nowotworów, a także o pełnionych przez nie funkcjach onkogennych. Wskazuje to, że również w GBM, mogą one pełnić rolę w procesach

zaangażowanych w jego rozwój i progresję. Zhuo i współautorzy odnotowali, że wysoki poziom SNORA38B w drobnokomórkowym raku płuc, a także raku pęcherzyka żółciowego ma związek z gorszym rokowaniem wśród pacjentów, a cząsteczka ta może działać jako onkogen poprzez promowanie proliferacji, migracji i inwazji komórek a także hamowanie apoptozy w tych nowotworach [302]. Podwyższony poziom SNORA38B był skorelowany również z wielkością guza czy przerzutami do węzłów chłonnych w przypadku raka piersi [303]. Badacze odnotowali wysoki poziom SNORA51 w raku wątrobowokomórkowym, a także raku piersi, co miało związek z gorszym rokowaniem wśród pacjentów [304, 305]. Wykazano również, że SNORA51 może wpływać na uzyskanie przez komórki właściwości podobnych do komórek macierzystych, promując proliferację, samoodnawianie się i migrację w raku piersi [305]. SNORA81 natomiast została opisana jako jedna z cząsteczek, której wysoki poziom pozwolił na odróżnienie tkanek pochodzących od pacjentów z rakiem jajnika od komórek obrzeży tego nowotworu, a także od zdrowej kontroli [306].

5.2. Potencjalna biogeneza sdrRNA

Mechanizm powstawania sdrRNA nie jest do końca poznany. Ze względu na wspólne loci genomowe dla snoRNA i miRNA, a także podobny rozkład długości miRNA i sdrRNA, sugeruje się, że biogeneza tych cząsteczek może być zbliżona [218, 219]. Przedstawione w rozprawie wyniki dotyczące frakcjonowania subkomórkowego, a także znakowania fluorescencyjnego i detekcji z wykorzystaniem metody FISH, wykazały, że zarówno SNORA77, SNORA81, jak i pochodzące z nich sdrRNA, kolejno: 1_707-5p, 1_707-3p oraz hsa-miR-1248, lokalizują się w jądrze, a ich obecność w cytoplazmie jest znikoma. Wyniki te sugerują, że w przeciwieństwie do miRNA, biogeneza badanych przeze mnie sdrRNA zachodzi wyłącznie w jądrze. W związku z tym, również białka biorące udział w tym procesie muszą być obecne w tym organellum.

W niniejszej pracy, w celu oceny potencjalnej biogenezy sdrRNA, z uwagi na zależne od struktury oddziaływanie enzymów biorących udział w dojrzewaniu miRNA, w pierwszej kolejności oceniono struktury drugorzędowe SNORA77 i SNORA81. Kolejno, z uwagi na wcześniejsze doniesienia literaturowe, oceniono potencjalny udział białek jądrowych FUS, DROSHA i AGO2 w przetwarzaniu snoRNA.

5.2.1. Analiza struktur drugorzędowych SNORA77 i SNORA81

Wykonane przeze mnie analizy *in silico* struktur drugorzędowych SNORA77 i SNORA81 wykazały, że sdrRNA pochodzące z tych snoRNA lokują się w regionach dwuniciowych przerwanych jedną lub dwiema pętlami, obejmując strukturę „spinki do włosów”. Dowiedziono, że zarówno DROSHA, jak i DICER, znane jako białka biorące udział w biogenezie miRNA, zawierają domeny wiążące dwuniciowe RNA i oddziałują z prekursorami dla miRNA poprzez mechanizmy zależne od struktury [307, 308]. Dowiedziono również, że miRNA powstające z udziałem białka AGO2, zawierają elementy pętli zewnętrznej obecnej w strukturze prekursorów dla miRNA, podczas gdy cząsteczki powstające z udziałem enzymu DICER, obejmują jedynie elementy pętli wewnętrznej [309]. Po obu stronach badanych w niniejszej pracy cząsteczek SNORA77 i SNORA81, obecna jest struktura „spinki do włosów”, która jest rozpoznawana przez enzymy DROSHA i DICER, co może świadczyć o ich udziale w przetwarzaniu badanych snoRNA. SdrRNA 1_707-5p pochodzący ze SNORA77, a także hsa-miR-1248 pochodzący ze SNORA81, obejmują element pętli wewnętrznej obecnej w strukturze ich prekursorów, natomiast cząsteczka 1_707-3p element pętli zewnętrznej obecnej w strukturze SNORA77. Może to sugerować udział enzymu DICER w powstawaniu 1_707-5p i hsa-miR-1248 oraz wskazuje na udział AGO2 w powstawaniu 1_707-3p. Zaobserwowałam, że w obrębie sekwencji SNORA81 lokuje się również znana cząsteczka prekursorowa dla hsa-miR-1248 – pre-miR-1248. W literaturze można znaleźć doniesienia o pochodzeniu hsa-miR-1248 ze SNORA81 [310]. Wykazano również, że znaczna część miRNA u ludzi jest kodowana w obrębie intronów, a analiza genomowa wykazała, że sekwencje wielu znanych miRNA znajdują się w sekwencjach snoRNA [218, 219]. Nasuwa się wniosek, że sekwencja cząsteczki hsa-miR-1248 znajduje się w intronie, z którego powstaje SNORA81, niewykluczone zatem, że jej biogeneza może zachodzić dwuetapowo: SNORA81 jest najpierw przetwarzana na pre-miR-1248, a kolejno na hsa-miR-1248, przez te same bądź inne białka.

5.2.2. Potencjalne białka biorące udział w przetwarzaniu snoRNA

W niniejszej pracy, oceniono wpływ białka FUS na poziom wybranych cząsteczek sdrRNA, jak i snoRNA. Dotychczas zidentyfikowano szereg snoRNA, a także miRNA o zróżnicowanym poziomie w linii komórkowej pozbawionej genu *FUS* [238, 239]. Doniesienia te, z uwagi na brak aktywności nukleolitycznej białka FUS, mogą sugerować jego pośredni wpływ na biogenezę sdrRNA.

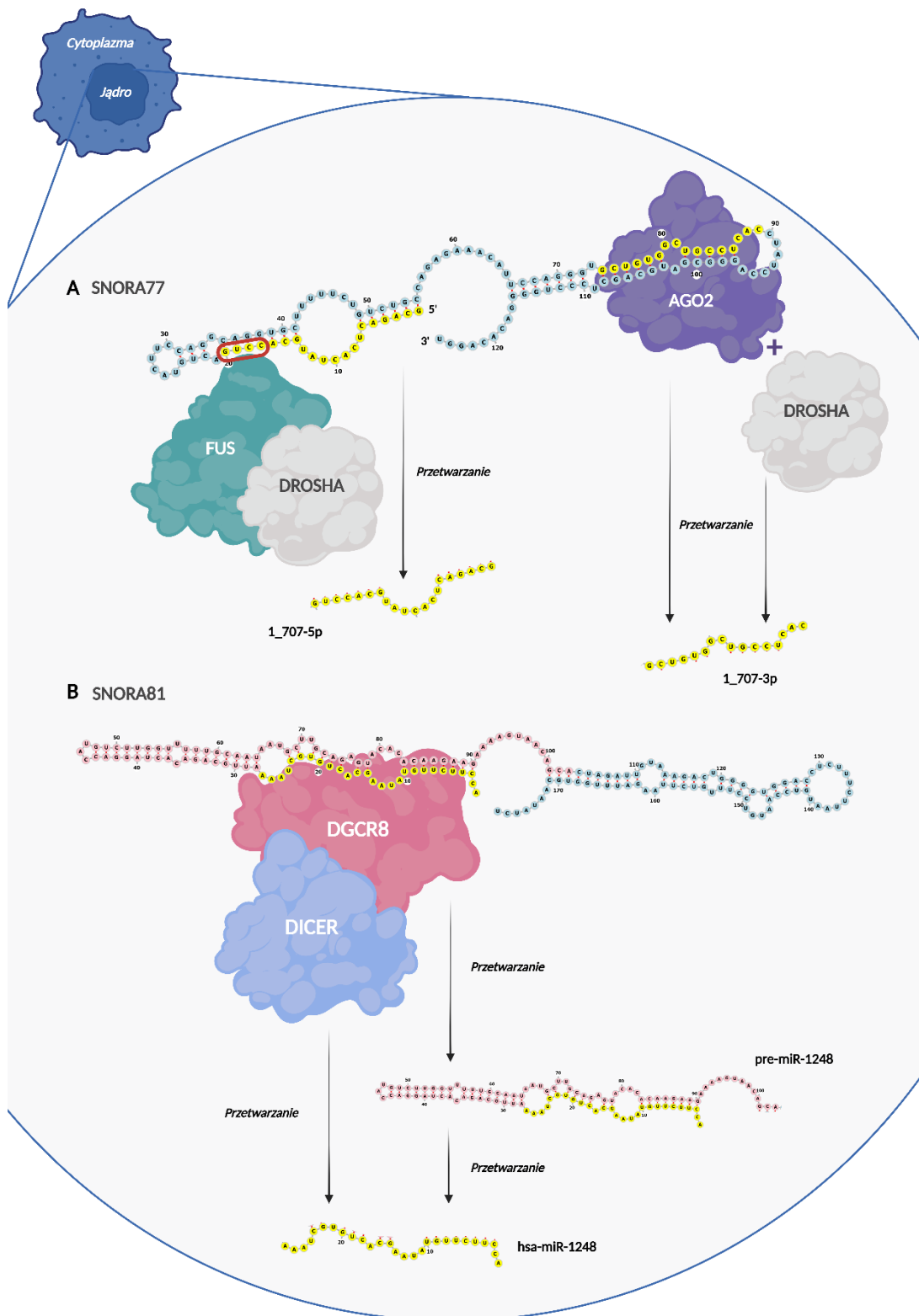
Wyniki przedstawione w niniejszej rozprawie wykazały, że delecja genu *FUS* miała wpływ na podwyższenie poziomu SNORA77, przy braku zmian w poziomie pochodzących z niej 1_707-5p i 1_707-3p. Jednocześnie, zwiększenie poziomu białka FUS spowodowało odwrotny efekt dla SNORA77, gdzie zaobserwowano obniżony poziom tej cząsteczki oraz wzrost poziomu sdRNA 1_707-5p, przy braku zmian w przypadku sdRNA 1_707-3p. Immunoprecypitacja białka FUS potwierdziła jednocześnie jego wiązanie ze SNORA77.

Dowiedziano, że białko FUS wiąże się z motywem CCUG w RNA [311], który jak wykazała przeprowadzona przeze mnie analiza, jest obecny w sekwencji SNORA77 w miejscu lokalizacji cząsteczki 1_707-5p na jej 3' końcu. Wykazano także, że białko FUS bierze udział w powstawaniu niektórych miRNA poprzez wiązanie do chromatyny w miejscu transkrypcji pri-miRNA, rekrutując jednocześnie białko DROSHA do tych miejsc [239], a Morlando i współautorzy potwierdzili wiązanie białka FUS z cząsteczkami pri-miRNA [239]. Doniesienia literaturowe wskazują, iż białko DGCR8 kieruje kompleks pri-miRNA do dalszej obróbki przez enzym DROSHA [312]. Wykonana przeze mnie analiza *in silico*, obejmująca sieć interakcji między wybranymi białkami, potwierdziła wiązanie białka FUS z białkiem DROSHA, wykluczyła natomiast wiązanie białka FUS z białkiem DGCR8. W następnym kroku, wykonałam immunoprecypitację białka DROSHA, która potwierdziła wiązanie z cząsteczką SNORA77, a analiza miejsc wiązania SNORA77 z wykorzystaniem bazy danych CLIPdb wykluczyła wiązanie tej cząsteczki z białkiem DGCR8. Wyniki te sugerują, że białko FUS może mieć pośredni udział w biogenezie cząsteczki 1_707-5p, zastępując niejako rolę białka DGCR8. Białko FUS wiążąc się z motywem CCUG obecnym w sekwencji SNORA77, może rekrutować białko DROSHA w celu przetworzenia tej cząsteczki.

Jak dowiedziano w niniejszej rozprawie, SNORA77 jest prekursorem również dla badanej 1_707-3p. Dla tej cząsteczki nie wykazano zmian w poziomie zarówno w komórkach pozbawionych genu *FUS*, jak i z podwyższonym poziomem tego białka. Wyniki te sugerują niezależny mechanizm powstawania obydwu cząsteczek ze SNORA77. Analiza struktury drugorzędowej SNORA77 i wspomniana wcześniej lokalizacja 1_707-3p w obrębie pętli zewnętrznej jej prekursora, może sugerować udział AGO2 w powstawaniu tej cząsteczki. Dowiedziano, że delecja genu *DROSHA*, wpływa na cytoplazmatyczną lokalizację AGO2, podczas gdy delecja genu białka wchodzącego w kompleks miRISC – *TNRC8* wpływa na jego jądrową lokalizację, co wskazuje na regulację lokalizacji subkomórkowej AGO2 w zależności od warunków panujących w komórce, w szczególności w komórkach nowotworowych, w tym lokalizacji białek zaangażowanych w przetwarzanie miRNA [229]. Choć w literaturze nie ma

dowodów na pełnienie funkcji nukleolitycznej przez AGO2 w jądrze, istnieją doniesienia o jego wiązaniu chromatyny czy niekodujących RNA, a największa liczba wiązań została odnotowana dla intronów [231, 313]. Frakcjonowanie wykonane w ramach niniejszej pracy, potwierdziło obecność białka AGO2 w jądrze w GBM. Immunoprecypitacja białek AGO2 i DROSHA potwierdziły ich wiązanie ze SNORA77, a wykonana analiza *in silico* potwierdziła wiązanie białka AGO2 z DROSHA. Przeprowadzone przeze mnie badania, a także doniesienia literaturowe mogą sugerować udział białka AGO2 w biogenezie 1_707-3p, albo w celu bezpośredniego cięcia SNORA77, albo w celu rekrutacji innych białek pełniących funkcje nukleolityczne, w tym białka DROSHA.

W odniesieniu do biogenezy badanej w niniejszej pracy hsa-miR-1248 powstającej z prekursorowej SNORA81, w komórkach pozbawionych genu *FUS*, nie odnotowano zmian w poziomie cząsteczki sdRNA. Jednocześnie, podwyższony poziom białka FUS spowodował obniżenie jej poziomu. Pomimo, że immunoprecypitacja białka FUS potwierdziła wiązanie tego białka ze SNORA81, wyniki dotyczące manipulacji poziomem tego białka, nie wskazują na jego udział w biogenezie hsa-miR-1248. Wykonany przeze mnie eksperyment immunoprecypitacji potwierdził wiązanie SNORA81 z białkiem DROSHA, a analiza korelacji między transkryptem tego białka a SNORA81, wykazała silną pozytywną korelację pomiędzy tymi cząsteczkami. W przypadku potencjalnego przetwarzania SNORA81 na hsa-miR-1248 przez białko DROSHA, korelacja między tymi cząsteczkami powinna być negatywna, gdyż wraz ze wzrostem poziomu DROSHA, poziom ciętych przez ten enzym cząsteczek SNORA81 powinien ulec obniżeniu, co sugeruje udział innej nukleazy w biogenezie hsa-miR-1248. Z kolei przeprowadzone w niniejszej pracy analizy *in silico* potwierdziły wiązanie SNORA81 z białkiem DGCR8, a także wiązanie białka DGCR8 z białkiem DICER. Macias i współautorzy wykazali, że delecja genu *DGCR8* miała wpływ na obniżenie poziomu sdRNA niezależnie od DROSHA, a także potwierdzili wiązanie białka DGCR8 ze snoRNA [224]. Odnotowano również obecność nukleazy DICER w jądrze, a także wykazano, że poziom większości sdRNA pochodzących z klasy H/ACA był niższy w komórkach z delecją genu tego białka [217]. Niewykluczone, że białko DGCR8 wiąże się ze SNORA81 w celu jego przetworzenia na hsa-miR-1248, a endonukleazą zaangażowaną w ten proces jest jądrowa DICER. Hipoteza ta wymaga jednak dalszej weryfikacji. Potencjalny udział białek biorących udział w biogenezie badanych w niniejszej pracy cząsteczek sdRNA 1_707-5p, 1_707-3p, a także hsa-miR-1248 został przedstawiony na Rycinie 34.



Rycina 34. Potencjalna biogeneza wybranych sdrRNA. A. Potencjalne białka biorące udział w mechanizmach powstawania cząsteczek 1_707-5p i 1_707-3p z ich prekursorowej SNORA77. **B.** Potencjalne białka biorące udział w mechanizmie powstawania cząsteczki hsa-miR-1248 z jej prekursorowej SNORA81.

5.3. Potencjalne funkcje wybranych sdRNA i snoRNA w GBM

5.3.1. Potencjalne funkcje sdRNA 1_707-5p, 1_707-3p i hsa-miR-1248 w GBM

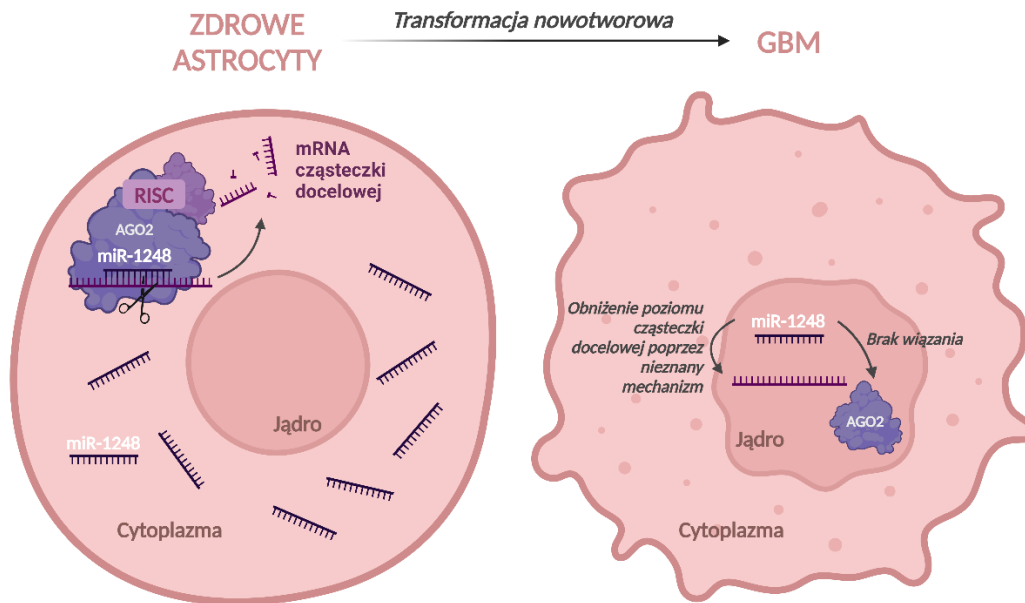
W kontraście do prekursorowej SNORA77, dla powstających z niej 1_707-3p i 1_707-5p, odnotowano podwyższenie ich poziomu w GBM. Z kolei analiza korelacji pomiędzy 1_707-5p, 1_707-3p a SNORA77, wykazała silną pozytywną korelację między obiema cząsteczkami sdRNA a SNORA77, co może być związane z wysokim zapotrzebowaniem na sdRNA pochodzące ze SNORA77 i jej szybkie przetwarzanie. Kolejną badaną cząsteczką sdRNA była hsa-miR-1248 powstająca ze SNORA81, dla której odnotowano najwyższy poziom w GBM w porównaniu do wszystkich walidowanych cząsteczek, co jest zbieżne ze wcześniejszymi doniesieniami o jej wysokim poziomie w tym nowotworze [244, 245]. Nie wykazano korelacji między hsa-miR-1248 a jej prekursorową SNORA81, co może wskazywać na pełnienie przez te cząsteczki niezależnych od siebie funkcji. Co ciekawe, zaobserwowano tendencję spadkową w zdrowym mózgu poziomu cząsteczki hsa-miR-1248 względem jej potencjalnych prekursorów: najwyższy poziom odnotowano dla cząsteczki SNORA81, niższy dla cząsteczki pre-miR-1248, a najniższy dla hsa-miR-1248. Może to wskazywać na wolniejsze przetwarzanie cząsteczki SNORA81 w zdrowym mózgu, co biorąc pod uwagę wysoki poziom hsa-miR-1248 w GBM, może sugerować udział tego sdRNA w nowotworzeniu.

Ocena tkankowo-zależnej specyficzności wykazała, że poziom zarówno 1_707-5p, 1_707-3p, jak i hsa-miR-1248 jest wyższy w GBM aniżeli innych badanych nowotworach i zdrowych liniach komórkowych. W literaturze nie ma doniesień dotyczących poziomu cząsteczek 1_707-5p oraz 1_707-3p w GBM, natomiast Chow i współautorzy wykazali, że pochodzące ze SNORA77 sdRNA jest skorelowane z przeżyciem pacjentów w różnych typach nowotworów. Brakuje jednak informacji wskazującej, czy mogłaby to być cząsteczka 1_707-5p czy 1_707-3p. W przypadku raka jasnokomórkowego nerki, pacjenci z wysokim poziomem tego sdRNA wykazywali niską przeżywalność, podczas gdy odwrotnie było w przypadku raka brodawkowatego nerki i raka wątroby. Nasuwa się wniosek, że sdRNA pochodzące ze SNORA77 można w różny sposób powiązać z przeżyciem pacjentów, nie tylko w przypadku różnych nowotworów, ale nawet w nowotworach o tym samym pochodzeniu, co świadczy o potencjale diagnostycznym tej cząsteczki. Z kolei dla hsa-miR-1248, poza odnotowanym wcześniej w literaturze jej wysokim poziomem w GBM [244, 245], badacze wykazali również jej wysoki poziom w astrocytach, natomiast w raku jelita grubego cząsteczka ta pełni rolę supresora hamując proliferację, migrację i inwazję [246, 247].

Wykazano, że większość cząsteczek sdRNA lokalizuje się w jądrze, niemniej jednak, z uwagi na doniesienia o ich roli w procesie interferencji RNA, sugeruje się, że mogą także być obecne w cytoplazmie [175, 219, 220]. Frakcjonowanie subkomórkowe przeprowadzone w niniejszej pracy, a także detekcja cząsteczki hsa-miR-1248 z wykorzystaniem metody FISH, wykazały, że zarówno 1_707-5p, 1_707-3p, jak i hsa-miR-1248 lokalizują się w jądrze zarówno w GBM, jak i zdrowych fibroblastach płucnych.

Dotychczas wykazano, że miRNA pochodzące ze snoRNA należących do rodziny H/ACA: miR-151, miR-605, mir-664, miR-215 i miR-140 wiążą się z dyskeryną, co sugeruje, że cząsteczki te mogą pełnić funkcje podobne do swoich prekursorowych snoRNA [219]. Wykazano, że w zdrowych astrocytach, gdzie hsa-miR-1248 charakteryzuje się wysokim poziomem, jego obniżenie za pomocą inhibitorów działających w cytoplazmie, spowodowało wzrost poziomu ekspresji cząsteczki docelowej dla hsa-miR-1248 - OGG1 [246]. W raku jelita grubego natomiast, gdzie cząsteczka ta jest na niskim poziomie, podwyższenie jej poziomu poprzez wprowadzenie dodatkowych kopii z wykorzystaniem plazmidu, spowodowało obniżenie poziomu ekspresji jej potencjalnej cząsteczki docelowej PSMD10. Dokładny mechanizm powodujący obniżenie ekspresji PSMD10 nie został jednak [247]. Wykazano, że białka wchodzące w kompleks RISC: TRBP, DICER i AGO2 są obecne w jądrze, aczkolwiek kompleks ten jest składany w cytoplazmie, a następnie przemieszcza się do jądra, gdzie możliwa jest regulacja genów przez krótkie RNA [314]. Immunoprecypitacja białka AGO2 wykonana w niniejszej pracy, nie potwierdziła wiązania tego białka z cząsteczką hsa-miR-1248, a także pozostałymi badanymi sdRNA: 1_707-5p i 1_707-3p. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy świadczą o jądrowej lokalizacji hsa-miR-1248 w GBM, a także jej potencjalnej biogenezie w tym organelum. Możliwe jednak, że w zdrowych astrocytach, biogeneza hsa-miR-1248 również zachodzi w jądrze, a następnie ulega eksportowi do cytoplazmy, gdzie pełni funkcję w interferencji RNA. Transformacja nowotworowa natomiast związana jest z jądrową lokalizacją tej cząsteczki, czy sekwestracją tego sdRNA w jądrze. Ta hipoteza może dotyczyć zarówno opisanych badań dotyczących raka jelita grubego, a także badanego w niniejszej rozprawie doktorskiej GBM. Z drugiej strony, wykazano, że proces nowotworzenia może powodować zmianę lokalizacji subkomórkowej białek biorących udział w biogenezie krótkich RNA [229]. Może to sugerować, że w zdrowych astrocytach hsa-miR-1248 powstaje w cytoplazmie, natomiast w stanach patologicznych jej przetwarzanie zachodzi w jądrze. Podsumowując, w zdrowych komórkach hsa-miR-1248 może mieć cytoplazmatyczną lokalizację i pełnić rolę w procesie interferencji RNA z udziałem białka AGO2, natomiast w

nowotworach, cząsteczka ta może pełnić funkcję w jądrze obniżając poziom genu docelowego poprzez inny mechanizm, niezwiązany z AGO2. Potencjalny mechanizm działania cząsteczki hsa-miR-1248 został przedstawiony na Rycinie 35.



Rycina 35. Potencjalny mechanizm działania cząsteczki hsa-miR-1248 w zdrowych astrocytach w cytoplazmie, a także w GBM w jądrze.

Wyniki uzyskane w pracy wykazały, że sdrRNA 1_707-5p, 1_707-3p i hsa-miR-1248 są związane z chromatyną. Tymczasem, w literaturze są doniesienia jedynie o pośrednim wpływie miRNA na strukturę chromatyny i dostępność miejsc transkrypcji, poprzez regulację ekspresji białek biorących udział w modyfikacji histonów [315]. Shi i współautorzy zidentyfikowali jednak sdrRNA-3 pochodzący prawdopodobnie ze snoRNA bądź snRNA w TAM obecnych w czerniaku u myszy. Cząsteczka ta hamuje transkrypcję genu *Nos2* poprzez zmniejszenie dostępności chromatyny w obrębie promotora tego genu, promując immunogenne funkcje TAM [316]. Wykazano również, że w białko FUS wiąże się z chromatyną i reguluje transkrypcję genów [317]. Immunoprecypitacja białka FUS wykonana w ramach rozprawy, potwierdziła wiązanie tego białka ze wszystkimi badanymi cząsteczkami sdrRNA. Niewykluczone, że cząsteczki te biorą udział w regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie do chromatyny wraz z białkiem FUS. W szczególności cząsteczka 1_707-5p, dla której odnotowano podwyższony poziom przy zwiększonym poziomie białka FUS, co może sugerować również zwiększenie stabilności tej cząsteczki dzięki wiązaniu z tym białkiem.

W niniejszej pracy, odnotowano obniżony poziom 1_707-5p, 1_707-3p i hsa-miR-1248 w warunkach niedoboru tlenu. W populacji GSC natomiast, nie zaobserwowano zmian w poziomie 1_707-3p i 1_707-5p, a poziom hsa-miR-1248 uległ podwyższeniu. Cząsteczki miRNA ulegają zróżnicowanej ekspresji w GBM w warunkach niedoboru tlenu [290]. Dowiedziono, że miR-224-3p wykazuje obniżoną ekspresję w warunkach hipoksyjnych i jest zaangażowany w inhibicję autofagii indukowanej niedotlenieniem [291], z kolei miR-210 odgrywa istotną rolę w adaptacji komórkowej do niedotlenienia oraz w przeżyciu i utrzymaniu populacji GSC [115]. Obniżony poziom badanych sdrRNA w warunkach hipoksji może mieć związek z poziomem bądź lokalizacją subkomórkową białek biorących udział w ich biogenezie. Przedstawione wyniki dotyczące hsa-miR-1248 mogą świadczyć o wysokim poziomie tej cząsteczki w populacji GSC znajdującej się w regionie okołonaczyniowym na obrzeżach guza, a nie w hipoksyjnym w jego środku, co sugeruje jej udział w progresji GBM. Hipoteza ta jest zbieżna z wynikami Catanzaro i współautorów, którzy wykazali, że w glejaku o niskim stopniu złośliwości, poziom hsa-miR-1248 był podwyższony w obrzeżach guza w porównaniu do jego środkowej części [261].

5.3.2. Potencjalne funkcje SNORA77 i SNORA81 w GBM

Dla cząsteczki SNORA77, jako jedynej z walidowanych w niniejszej pracy, odnotowano obniżony poziom w GBM w odniesieniu do zdrowego mózgu. Analiza korelacji między SNORA77 a powstającymi z niej sdrRNA 1_707-5p i 1_707-3p, wykazała silną pozytywną korelację między tymi cząsteczkami. Przeprowadzone badania wykazały również wysoki poziom ekspresji w GBM w porównaniu do zdrowej kontroli „genu gospodarza” SNORA77 - ATP2B4. Jest to zbieżne z wynikami Ruano i współautorów, którzy również odnotowali podwyższony poziom ekspresji ATP2B4 w GBM, ale także amplifikację w jego genie kodującym [318]. Wyniki te mogą wskazywać na istotną rolę SNORA77 w GBM, gdyż po przetworzeniu SNORA77 na sdrRNA, strata w poziomie tej cząsteczki jest rekompensowana. Sugeruje to również niezależne od siebie mechanizmy działania zarówno ATP2B4, SNORA77, jak i powstających z niej sdrRNA.

Z kolei druga badana w niniejszej pracy cząsteczka SNORA81 wykazała podwyższony poziom w GBM w odniesieniu do zdrowego mózgu. Wykazano brak korelacji między SNORA81 a pochodzącą z niej hsa-miR-1248, a także między SNORA81 a jej „genem gospodarza” – EIF4A2. Ponadto, dla SNORA81 odnotowano wyższy poziom w GBM aniżeli dla EIF4A2. Mimo, że istnieje powszechne przekonanie, że poziom snoRNA jest pozytywnie skorelowany z poziomem ich „genów gospodarza”, w literaturze istnieje wiele doniesień, że

liczebność większości snoRNA nie koreluje bądź wykazuje negatywną korelację z liczebnością „genów gospodarza” [319-321]. Wielkoskalowa analiza obliczeniowa interakcji RNA:RNA wykazała, że 30 % wykrytych snoRNA wchodzi w interakcję z transkryptami swoich „genów gospodarza”. Najbardziej prawdopodobna wydawała się być możliwa interakcja pomiędzy SNORD2 również powstającego z intronu EIF4A2, gdzie SNORD2 wiążąc się z intronową sekwencją pre-mRNA EIF4A2 maskuje miejsce, do którego przyłącza się sąsiedni ekson, wpływając na splicing EIF4A2 i poziom dojrzałego mRNA [322]. Dowiedziono również, że SNORD86 moduluje poziom ekspresji swojego „genu gospodarza” NOP56 w odpowiedzi na poziom powstającego z tego genu białka o tej samej nazwie [195]. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy sugerują niezależny mechanizm działania EIF4A2 i SNORA81, a brak korelacji między SNORA81 a jej „genem gospodarza” wskazuje, że SNORA81 nie wpływa na poziom ekspresji EIF4A2.

Ocena tkankowo-zależnej specyficzności wykazała, że poziom SNORA77 jest wyższy w GBM aniżeli innych badanych nowotworach i zdrowych liniach komórkowych, za wyjątkiem zdrowych fibroblastów. Z kolei w przypadku SNORA81, zaobserwowano odwrotną zależność, ponieważ w GBM odnotowano niższy poziom niż w innych badanych nowotworach i zdrowych liniach komórkowych. W literaturze nie ma doniesień dotyczących poziomu SNORA77 w nowotworach, natomiast wysoki poziom SNORA81 został potwierdzony w raku jajnika, pełniąc rolę w inhibicji apoptozy, a także wpływając na zwiększoną proliferację czy migrację komórek [306].

Zgodnie z doniesieniami literaturowymi dotyczącymi głównie jądrowej lokalizacji snoRNA pochodzących z klasy H/ACA, frakcjonowanie subkomórkowe przeprowadzone w niniejszej pracy potwierdziło, że zarówno SNORA77 i SNORA81 lokalizują się w jądrze zarówno w GBM, jak i zdrowych fibroblastach płucnych. Wykazałam również, że obie cząsteczki snoRNA są związane z chromatyną. Dane literaturowe potwierdzają, że snoRNP w miarę wzrostu i spadku zapotrzebowania na funkcje jądrowe, mogą krążyć pomiędzy nim a ciałkami Cajala [181], co może wskazywać na zmianę lokalizacji również badanych snoRNA pomiędzy jądrem a jądrem – miejscem lokalizacji chromatyny. Schubert i współautorzy odnotowali wiele cząsteczek snoRNA związanych z chromatyną, zarówno w fibroblastach, jak i komórkach raka szyjki macicy, w tym cząsteczkę SNORA81. Co więcej, wykazali również, że snoRNA mogą wiązać się z białkiem DF31 obecnym u *Drosophila melanogaster*, regulując dostępność chromatyny w określonych regionach genomu [323]. Również w białaczce odnotowano wiele snoRNA związanych z chromatyną, gdzie SNORA73 wiążąc się z PARP1

– białkiem kluczowym w procesie naprawy DNA, regulując proces różnicowania komórek zależny od uszkodzeń DNA [196]. Co więcej, badacze wykazali, że białka AGO1 i AGO2 są wymagane do przebudowy struktury chromatyny i wydajności splicingu [324], a immunoprecypitacja białka AGO2 wykonana w niniejszej rozprawie, potwierdziła wiązanie tego białka zarówno ze SNORA77, jak i SNORA81. Niewykluczone, że cząsteczki te wiążąc się z białkami wiążącymi chromatynę, wpływają na jej konformację, a co za tym idzie transkrypcję genów, również tych związanych z nowotworzeniem.

W niniejszej pracy, w warunkach hipoksji w GBM odnotowano podwyższony poziom zarówno SNORA77, jak i SNORA81. Jednocześnie, nie zaobserwowano zmian w poziomie ich „genów gospodarza”, co sugeruje, że te snoRNA mogą odgrywać samodzielną rolę w warunkach niedoboru tlenu w GBM. Wang i współautorzy przeanalizowali poziom snoRNA w zdrowych tkankach, w tym w mózgu i zaobserwowali ich podobny poziom zarówno w warunkach normoksji, jak i hipoksji [325]. Ta obserwacja dodatkowo wskazuje na rolę badanych SNORA77 i SNORA81 w GBM. W nowotworach obserwuje się specyficzne mechanizmy molekularne i adaptacyjne w zmieniających się warunkach środowiska, inne niż w zdrowych tkankach, przykładowo w hipoksji. Metge i współautorzy wykazali, że w warunkach hipoksji, rRNA wykazuje inny wzór metylacji w porównaniu z normoksją, co skutkuje zwiększonym rozpoznawaniem miejsca rozpoczęcia translacji w rybosomie (IRES, ang. *Internal Ribosome Entry Site*) dla VEGF, który jest głównym czynnikiem stymulującym angiogenezę, ułatwiając dostarczenie tlenu do komórek [326]. Badacze powiązali również poziom cząsteczki SNORA81 z poziomem modyfikacji rRNA, gdyż obniżenie poziomu tej cząsteczki hamowało pseudourydylację i biogenezę rybosomów [306]. W rozwoju GBM obserwuje się zwiększoną aktywność rybosomów, z uwagi na większe zapotrzebowanie na produkcję białek – szczególnie tych związanych z nowotworzeniem [327]. Może to wskazywać na rolę badanych SNORA77 i SNORA81 w adaptacji do warunków stresowych poprzez regulację biogenezy rybosomów.

Z racji tego, że hipoksja jest ważna dla utrzymania populacji GSC, która znajduje się głównie w niedotlenionych i okołonaczyniowych obszarach masy guza, ocenie poddano również poziom snoRNA w tej populacji. Wykazano, że poziom SNORA81 jest podwyższony we frakcji GSC, z kolei poziom SNORA77 nie zmienił się. Może to sugerować, że SNORA81 są obecne w GSC lokalizujących się w obszarach nekrotycznych. Jednocześnie, SNORA77 i SNORA81 wraz z innymi badanymi snoRNA są obecne również w EV, co sugeruje ich udział w komunikacji międzykomórkowej, a co za tym idzie modulacji TME, wpływając na obecną

w nim immunosupresję. Obecność SNORA77 i SNORA81 została także odnotowana w plazmie pacjentów z GBM, gdzie prawdopodobnie jako wolnokrążące cząsteczki, mogą odgrywać rolę w inwazji tego nowotworu. Obecność i rola snoRNA w EV, a także w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM została szerzej opisana w podrozdziale 5.4.

5.4. Potencjał prognostyczny i diagnostyczny sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA w GBM

5.4.1. Udział badanych sdRNA i snoRNA w podtypowaniu GBM

Ze względu na wysoką heterogenność GBM przejawiającą się również widocznymi różnicami między podtypami na poziomie molekularnym, badacze wciąż poszukują nowych metod klasyfikacji tego nowotworu, opartych również o profil ncRNA [77, 78].

Valleron i współautorzy wykazali, że cząsteczki snoRNA mogą okazać się przydatne w diagnostyce niektórych podtypów chłoniaka, a także prognozowaniu wśród pacjentów leczonych chemioterapią, a szczególnie obiecująca okazała się cząsteczka SNORD71 [328]. Analiza bioinformatyczna obejmująca 31 nowotworów, wykazała, że cząsteczki snoRNA, a w szczególności te pochodzące z klasy H/ACA, mogą służyć w celu stratyfikacji, a także oceny prognozy wśród pacjentów w gruczolakoraku trzustki, raku płaskonabłonkowym płuc, glejakach o niskim stopniu złośliwości i raku nerki [329]. Analiza ta nie obejmowała jednak GBM, a w literaturze brak jest doniesień o zróżnicowanym profilu sdRNA, jak i snoRNA w podtypach molekularnych tego nowotworu.

W niniejszej pracy, w celu oceny, czy zarówno sdRNA, jak i ich prekursorowe snoRNA, mogą przyczynić się do lepszej klasyfikacji GBM, zweryfikowano ich poziom w znanych podtypach tego nowotworu: proneuralnym, klasycznym i mezenchymalnym. Wśród nich jedynie sdRNA 1_707-3p wykazała podwyższony poziom w podtypie mezenchymalnym w porównaniu do innych podtypów i zdrowej kontroli. W przypadku tej cząsteczki, a także snoRNA SCARNA6 odnotowano podwyższony poziom w najbardziej agresywnym podtypie - mezenchymalnym, a najniższy w podtypie charakteryzującym się najniższą agresywnością – proneuralnym, co może wskazywać na prognostyczne znaczenie tych cząsteczek w GBM. Z wyjątkiem SCARNA6, dla większości badanych w pracy snoRNA, ich poziom nie różnił się znacznie między podtypami GBM, zatem cząsteczki te wydają się nie być użyteczne w lepszym podtypowaniu tego nowotworu.

5.4.2. SdRNA i snoRNA w komunikacji międzykomórkowej w GBM

Wyniki uzyskane w pracy doktorskiej wskazują na obecność wszystkich badanych cząsteczek sdRNA, jak i ich prekursorowych snoRNA w EV pozyskanych z medium hodowlanego komórek GBM. Najwyższy poziom wykazano dla cząsteczek hsa-miR-3653-5p, 17_9367-5p i 20_10199-5p a w przypadku snoRNA, dla SNORA60 i SNORA11. Jedną z badanych cząsteczek jest SNORA77, której wysoki poziom został odnotowany również w EV wyizolowanych z medium hodowlanego raka jelita grubego [330].

EV uczestniczą w przekazywaniu cząsteczek, w tym ncRNA, do sąsiednich komórek, ale także mają zdolność do przekroczenia BBB i są obecne w płynach ustrojowych [131, 132]. EV uczestniczące w komunikacji międzykomórkowej w obrębie nowotworu, odgrywają kluczową rolę wpływając na jego TME [119-123]. Badacze wykazali, że EV przenoszące miRNA między komórkami GBM, mogą przyczyniać się nie tylko do zwiększonego tempa rozwoju komórek, ale także do hamowania apoptozy [128, 129]. Co więcej, w EV wyizolowanych z komórek GBM opornych na TMZ odnotowano wysoki poziom miR-1238, a transport tej cząsteczki z komórek GBM opornych na chemioterapię, wywołał oporność na ten chemioterapeutyk w dotychczas wrażliwych komórkach [130]. Wykazano również, że transfer cząsteczek miRNA za pośrednictwem EV w dużej mierze prowadzi do zwiększonej heterogenności w GBM [331, 332]. Z kolei analiza sekwencjonowania obejmująca 32 różne nowotwory wykazała, że sdRNA są istotnie skorelowane z cechami TME, takimi jak markery immunosupresyjne, aktywność limfocytów T czy unaczynienie guza [251]. Wiele badań wskazuje również na rolę snoRNA w aktywacji, proliferacji, rozwoju i ekspresji limfocytów T oraz limfocytów B, a także w komunikacji międzykomórkowej i polaryzacji makrofagów czy produkcji cytokin [333-335]. Biorąc pod uwagę powyższe doniesienia, a także obecność wszystkich badanych w niniejszej pracy sdRNA i snoRNA w EV, można przypuszczać, że EV mogą modulować TME, a także wpływać na heterogenność GBM, również poprzez obecne w nich zarówno sdRNA, jak i snoRNA.

5.4.3. SdRNA i snoRNA jako potencjalne biomarkery GBM

W niniejszej pracy ocenie poddano również poziom badanych sdRNA i snoRNA w plazmie pacjentów ze zdiagnozowanym GBM. Dodatkowo, przeprowadzono analizę wyników sekwencjonowania RNA wyizolowanego z EV obecnych w plazmie pacjentów z GBM, jak i osób zdrowych. Plazma została oddzielona od komórek poprzez wirowanie przy wysokich obrotach, w wyniku czego znajdujące się w niej cząsteczki są wolnokrążące lub mogą

pochodzić z EV. Większość badanych sdRNA była obecna w plazmie pacjentów, a cząsteczki 1_707-3p, hsa-miR-664a-3p, hsa-miR-664b-3p zostały odnotowane we wszystkich badanych próbach. Z kolei w przypadku badanych snoRNA, tylko 3 cząsteczki były obecne w co najmniej 75 % prób, były to SNORA81, SNORA77 i SNORA63. Ze względu na obecność tych cząsteczek w plazmie, mogą one odpowiadać za pozamózgowe przerzuty GBM, które jednak występują niezwykle rzadko. Niewykluczone również, że skoro cząsteczki te obecne są we krwi, mogą także odgrywać rolę w nieuniknionej często wznowie GBM, pojawiającej się w innych miejscach w mózgu. W literaturze odnotowano podwyższony poziom SNORA77 w płytkach krwi pacjentów z różnymi nowotworami w porównaniu do płytek krwi zdrowych osób czy poziomu tej cząsteczki w tkance nowotworowej [336]. Możliwe, że obecność SNORA77 w plazmie wynika z rozpadu obecnych w niej płytek krwi i uwolnienie zawartych w nich cząsteczek.

Badacze wykazali, że cząsteczki obecne w EV są bardziej stabilne od tych wolnokrążących, co czyni je obiecującymi biomarkerami GBM [118, 133]. Dowiedziono również, że stężenie EV obecnych w plazmie u pacjentów z GBM jest wyższe w porównaniu z pacjentami z innymi chorobami OUN, a także ze zdrową grupą kontrolną [134]. W literaturze można znaleźć wiele doniesień o ncRNA obecnych w płynach ustrojowych pełniących rolę biomarkerów w różnych nowotworach. Najwięcej badań dotyczy cząsteczek miRNA, których poziom w EV pochodzących z plazmy pozwolił na odróżnienie pacjentów z GBM od zdrowych osób [167, 168], a także na odróżnienie glejaków o różnym stopniu złośliwości [170], czy nawet ocenę potencjalnej wznowy GBM [171]. Brakuje jednak doniesień o potencjalnych biomarkerach GBM w postaci sdRNA. W przypadku snoRNA, badacze odnotowali zróżnicowany poziom tych cząsteczek w surowicy krwi, a także w moczu, który rozróżnił pacjentów z rakiem nerki od zdrowych osób [337-339]. Z kolei we krwi utajonej w kale pacjentów z rakiem jelita grubego, potencjalnym markerem okazała się być badana w niniejszej pracy cząsteczka SNORA51 [340]. Savelyeva i współautorzy odnotowali również podwyższony poziom SNORD113 i SNORD78 w EV pacjentów z niedrobnokomórkowym rakiem płuc [341] czy rakiem wątrobowokomórkowym [342].

Aby ocenić, czy cząsteczki sdRNA i snoRNA obecne w plazmie są wolnokrążące czy znajdują się w EV, wykonano analizę wyników sekwencjonowania RNA wyizolowanego z EV obecnych w plazmie pacjentów z GBM. Dodatkowo, w celu poszukiwania biomarkerów GBM, porównano otrzymane wyniki z poziomem tych cząsteczek obecnych w EV wyizolowanych z plazmy osób zdrowych. Analiza sekwencjonowania zidentyfikowała jedynie 6 cząsteczek

sdRNA, których poziom nie różnił się istotnie między badanymi grupami. Ponadto wykryto 2 cząsteczki snoRNA: SNORA33 i badaną w niniejszej pracy SNORA36B, których poziom w EV obecnych w plazmie pacjentów z GBM był niższy niż w plazmie zdrowych osób. Wyniki sekwencjonowania dotyczące SNORA36B nie pokryły się z wynikami dotyczącymi obecności tej cząsteczki w plazmie. Może być to spowodowane ogólnym niskim poziomem SNORA36B w badanych próbach GBM, gdyż analiza sekwencjonowania wykazała jej wyższy poziom w EV wyizolowanych z plazmy zdrowych osób. Mimo potencjału diagnostycznego, jaki został odnotowany dla miRNA w GBM czy snoRNA w różnych nowotworach, wydaje się, że badane w niniejszej pracy cząsteczki obecne w EV w plazmie nie są dobrymi biomarkerami, gdyż nie pozwoliły one na odróżnienie pacjentów z GBM od osób zdrowych. Jednakże, ciekawe wydają się być cząsteczki sdRNA 1_707-3p, hsa-miR-664a-3p i hsa-miR-664b-3p czy SNORA77 i SNORA63, które są obecne w plazmie wszystkich badanych pacjentów z GBM prawdopodobnie jako wolnokrążące cząsteczki. Analiza potencjału diagnostycznego wybranych sdRNA i snoRNA wymaga jednak dalszych badań i optymalizacji. Aby ustalić, czy cząsteczki te mogłyby pełnić rolę biomarkerów w GBM, należałoby przede wszystkim zwiększyć liczbę prób oraz zbadać i porównać ich obecność w plazmie zdrowych osób. Ponadto, tkanki GBM pochodzące od tych samych pacjentów należałoby przeanalizować nie tylko pod kątem poziomu sdRNA i snoRNA, ale także określić podtyp GBM. To umożliwiłoby ocenę, czy sdRNA i snoRNA są obecne w plazmie pacjentów z konkretnym podtypem GBM, co niewątpliwie mogłoby ulepszyć diagnostykę tego nowotworu.

Wnioski

Głównym celem niniejszej rozprawy doktorskiej była identyfikacja i charakterystyka sdRNA i snoRNA, a także określenie ich roli w rozwoju i progresji GBM. Oceniono również potencjał prognostyczny jak i diagnostyczny wybranych cząsteczek, a także oddziaływania z białkami potencjalnie biorącymi udział w biogenezie sdRNA.

Na podstawie uzyskanych wyników, wysunięto następujące wnioski:

- 1. Poziom sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA jest zróżnicowany w GBM.** Wykazano, że poziom prawie wszystkich badanych sdRNA oraz ich prekursorowych snoRNA, za wyjątkiem SNORA77, ulega podwyższeniu w GBM w porównaniu do kontroli zdrowego mózgu. Pozwoliło to na selekcję kandydatów sdRNA potencjalnie zaangażowanych w rozwój tego nowotworu: 1_707-5p, 1_707-3p oraz hsa-miR-1248.
- 2. Badane sdRNA i snoRNA biorą udział w komunikacji międzykomórkowej.** Wszystkie badane cząsteczki sdRNA, jak i snoRNA są obecne w pęcherzykach komórkowych (EV) pozyskanych z medium hodowlanego komórek GBM, co może sugerować ich udział w modulacji mikrośrodowiska nowotworu.
- 3. Badane sdRNA i snoRNA nie wykazują potencjału diagnostycznego.** Potwierdzono obecność badanych sdRNA i snoRNA w plazmie pochodzącej od pacjentów ze zdiagnozowanym GBM, wskazując na ich udział w progresji nowotworu. Jednocześnie, z uwagi na brak wyraźnych różnic w ich poziomie w EV w plazmie pacjentów z GBM i osób zdrowych, badane cząsteczki nie wykazują potencjału diagnostycznego.
- 4. Badane sdRNA i snoRNA lokalizują się w jądrze i są związane z chromatyną.** Frakcjonowanie subkomórkowe wykazało, że badane cząsteczki sdRNA lokalizują się w jądrze i są związane z chromatyną, co ma związek z pełnioną przez nie funkcją, a także biogenezą sdRNA. Cząsteczka 1_707-5p może brać udział w regulacji ekspresji genów poprzez wiązanie do chromatyny wraz z białkiem FUS. Cząsteczki SNORA77 i SNORA81 mogą wiązać się do chromatyny poprzez białko AGO2, wpływając na splicing.
- 5. SdRNA hsa-miR-1248 ulega podwyższeniu w populacji komórek macierzystych (GSC), a także może zmieniać lokalizację subkomórkową w zależności od stanu patologicznego.** SdRNA hsa-miR-1248 może występować w populacji GSC znajdującej się w regionie okołonaczyniowym na obrzeżach guza, co sugeruje jej udział w progresji GBM. Cząsteczka ta może mieć cytoplazmatyczną lokalizację i pełnić rolę

w procesie interferencji RNA w zdrowych komórkach, natomiast po transformacji nowotworowej, cząsteczka ta może pełnić swoją funkcję w jądrze obniżając poziom genu docelowego poprzez nieznaną mechanizm.

6. **SNORA81 ulega podwyższeniu w populacji GSC, cząsteczka ta, a także SNORA77 mogą odgrywać samodzielną rolę w warunkach niedoboru tlenu w GBM.** Analiza poziomu wybranych snoRNA w warunkach hipoksji, a także frakcji GSC, sugeruje odmienny udział badanych cząsteczek w rozwoju i progresji tego nowotworu.
7. **Badane sdrRNA wykazują odmienne mechanizmy biogenezy.** Powstające ze SNORA77 cząsteczki 1_707-5p i 1_707-3p powstają niezależnie: sdrRNA 1_707-5p może powstawać z udziałem białek FUS i DROSHA, a sdrRNA 1_707-3p z udziałem białka AGO2. W biogenezę hsa-miR-1248 powstającej ze SNORA81 mogą być zaangażowane białka DGCR8 i DICER.

Bibliografia

1. Sadetzki, S., et al., *Long-term follow-up for brain tumor development after childhood exposure to ionizing radiation for tinea capitis*. Radiat Res, 2005. **163**(4): p. 424-32.
2. Ostrom, Q.T., S.S. Francis, and J.S. Barnholtz-Sloan, *Epidemiology of Brain and Other CNS Tumors*. Curr Neurol Neurosci Rep, 2021. **21**(12): p. 68.
3. Louis, D.N., et al., *The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary*. Neuro Oncol, 2021. **23**(8): p. 1231-1251.
4. Reni, M., et al., *Central nervous system gliomas*. Crit Rev Oncol Hematol, 2017. **113**: p. 213-234.
5. Torp, S.H., O. Solheim, and A.J. Skjulsvik, *The WHO 2021 Classification of Central Nervous System tumours: a practical update on what neurosurgeons need to know-a minireview*. Acta Neurochir (Wien), 2022. **164**(9): p. 2453-2464.
6. Seifert, M., et al., *Molecular Characterization of Astrocytoma Progression Towards Secondary Glioblastomas Utilizing Patient-Matched Tumor Pairs*. Cancers (Basel), 2020. **12**(6).
7. Lee, J., et al., *Oligodendrogliomas, IDH-mutant and 1p/19q-codeleted, arising during teenage years often lack TERT promoter mutation that is typical of their adult counterparts*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 95.
8. Dunn, G.P., et al., *Emerging insights into the molecular and cellular basis of glioblastoma*. Genes Dev, 2012. **26**(8): p. 756-84.
9. Collins, V.P., D.T. Jones, and C. Giannini, *Pilocytic astrocytoma: pathology, molecular mechanisms and markers*. Acta Neuropathol, 2015. **129**(6): p. 775-88.
10. Cimino, P.J., et al., *Expanded analysis of high-grade astrocytoma with piloid features identifies an epigenetically and clinically distinct subtype associated with neurofibromatosis type 1*. Acta Neuropathol, 2023. **145**(1): p. 71-82.
11. Ebrahimi, A., et al., *Pleomorphic xanthoastrocytoma is a heterogeneous entity with pTERT mutations prognosticating shorter survival*. Acta Neuropathol Commun, 2022. **10**(1): p. 5.
12. Gao, C., et al., *Subependymal Giant Cell Astrocytomas in Tuberous Sclerosis Complex-Current Views on Their Pathogenesis and Management*. J Clin Med, 2023. **12**(3).
13. Goode, B., et al., *A recurrent kinase domain mutation in PRKCA defines chordoid glioma of the third ventricle*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 810.
14. Hirose, T., et al., *Astroblastoma: a distinct tumor entity characterized by alterations of the X chromosome and MNI rearrangement*. Brain Pathol, 2018. **28**(5): p. 684-694.
15. Pekmezci, M., et al., *The genetic landscape of ganglioglioma*. Acta Neuropathol Commun, 2018. **6**(1): p. 47.
16. Pages, M., et al., *Papillary glioneuronal tumors: histological and molecular characteristics and diagnostic value of SLC44A1-PRKCA fusion*. Acta Neuropathol Commun, 2015. **3**: p. 85.
17. Handa, H., et al., *Molecular analyses of rosette-forming glioneuronal tumor of the midbrain tegmentum: A report of two cases and a review of the FGFR1 status in unusual tumor locations*. Surg Neurol Int, 2022. **13**: p. 213.
18. Caporalini, C., et al., *Myxoid glioneuronal tumor: Histopathologic, neuroradiologic, and molecular features in a single center series*. Neoplasia, 2023. **37**: p. 100885.
19. Grochans, S., et al., *Epidemiology of Glioblastoma Multiforme-Literature Review*. Cancers (Basel), 2022. **14**(10).
20. Jakel, S. and L. Dimou, *Glial Cells and Their Function in the Adult Brain: A Journey through the History of Their Ablation*. Front Cell Neurosci, 2017. **11**: p. 24.

21. Kumaria, A., et al., *Glioblastoma multiforme metastatic to lung in the absence of intracranial recurrence: case report*. Br J Neurosurg, 2022. **36**(2): p. 290-292.
22. Strong, M.J., et al., *Bone metastasis from glioblastoma: a systematic review*. J Neurooncol, 2022. **158**(3): p. 379-392.
23. Ghous, G., et al., *A Rare Case of Glioblastoma With Extensive Liver Metastases*. Oncology (Williston Park), 2021. **35**(11): p. 733-740.
24. Batash, R., et al., *Glioblastoma Multiforme, Diagnosis and Treatment; Recent Literature Review*. Curr Med Chem, 2017. **24**(27): p. 3002-3009.
25. Razavi, S.M., et al., *Immune Evasion Strategies of Glioblastoma*. Front Surg, 2016. **3**: p. 11.
26. Fabbro-Peray, P., et al., *Association of patterns of care, prognostic factors, and use of radiotherapy-temozolomide therapy with survival in patients with newly diagnosed glioblastoma: a French national population-based study*. J Neurooncol, 2019. **142**(1): p. 91-101.
27. Li, K., et al., *Trends and patterns of incidence of diffuse glioma in adults in the United States, 1973-2014*. Cancer Med, 2018. **7**(10): p. 5281-5290.
28. Newcomb, E.W., et al., *Survival of patients with glioblastoma multiforme is not influenced by altered expression of p16, p53, EGFR, MDM2 or Bcl-2 genes*. Brain Pathol, 1998. **8**(4): p. 655-67.
29. Gilard, V., et al., *Diagnosis and Management of Glioblastoma: A Comprehensive Perspective*. J Pers Med, 2021. **11**(4).
30. Schiff, D., et al., *Medical management of brain tumors and the sequelae of treatment*. Neuro Oncol, 2015. **17**(4): p. 488-504.
31. Li, J., L. Feng, and Y. Lu, *Glioblastoma multiforme: Diagnosis, treatment, and invasion*. J Biomed Res, 2022. **37**(1): p. 47-58.
32. Ruiz-Lopez, E., et al., *Diagnosis of Glioblastoma by Immuno-Positron Emission Tomography*. Cancers (Basel), 2021. **14**(1).
33. Chamberlain, M.C., *Radiographic patterns of relapse in glioblastoma*. J Neurooncol, 2011. **101**(2): p. 319-23.
34. Wirsching, H.G., E. Galanis, and M. Weller, *Glioblastoma*. Handb Clin Neurol, 2016. **134**: p. 381-97.
35. Yuan, Z., et al., *Exosome-Mediated Transfer of Long Noncoding RNA HOTAIR Regulates Temozolomide Resistance by miR-519a-3p/RRM1 Axis in Glioblastoma*. Cancer Biother Radiopharm, 2020.
36. Stupp, R., et al., *Radiotherapy plus concomitant and adjuvant temozolomide for glioblastoma*. N Engl J Med, 2005. **352**(10): p. 987-96.
37. Jiapaer, S., et al., *Potential Strategies Overcoming the Temozolomide Resistance for Glioblastoma*. Neurol Med Chir (Tokyo), 2018. **58**(10): p. 405-421.
38. Campos, B., et al., *A comprehensive profile of recurrent glioblastoma*. Oncogene, 2016. **35**(45): p. 5819-5825.
39. Garcia, J., et al., *Bevacizumab (Avastin(R)) in cancer treatment: A review of 15 years of clinical experience and future outlook*. Cancer Treat Rev, 2020. **86**: p. 102017.
40. Pajak, B., *Looking for the Holy Grail-Drug Candidates for Glioblastoma Multiforme Chemotherapy*. Biomedicines, 2022. **10**(5).
41. Xiao, Z.Z., et al., *Carmustine as a Supplementary Therapeutic Option for Glioblastoma: A Systematic Review and Meta-Analysis*. Front Neurol, 2020. **11**: p. 1036.
42. Tsai, C.K., et al., *SNAP reverses temozolomide resistance in human glioblastoma multiforme cells through down-regulation of MGMT*. FASEB J, 2019. **33**(12): p. 14171-14184.

43. Wu, W., et al., *Glioblastoma multiforme (GBM): An overview of current therapies and mechanisms of resistance*. Pharmacol Res, 2021. **171**: p. 105780.
44. Vengoji, R., et al., *Afatinib and Temozolomide combination inhibits tumorigenesis by targeting EGFRvIII-cMet signaling in glioblastoma cells*. J Exp Clin Cancer Res, 2019. **38**(1): p. 266.
45. Rominiyi, O., et al., *Tumour treating fields therapy for glioblastoma: current advances and future directions*. Br J Cancer, 2021. **124**(4): p. 697-709.
46. Khan, A.B., et al., *Prolonged survival after laser interstitial thermal therapy in glioblastoma*. Surg Neurol Int, 2021. **12**: p. 228.
47. Rocha Pinheiro, S.L., et al., *Immunotherapy in glioblastoma treatment: Current state and future prospects*. World J Clin Oncol, 2023. **14**(4): p. 138-159.
48. Pombo Antunes, A.R., et al., *Understanding the glioblastoma immune microenvironment as basis for the development of new immunotherapeutic strategies*. Elife, 2020. **9**.
49. Janjua, T.I., et al., *Frontiers in the treatment of glioblastoma: Past, present and emerging*. Adv Drug Deliv Rev, 2021. **171**: p. 108-138.
50. Olympios, N., et al., *TERT Promoter Alterations in Glioblastoma: A Systematic Review*. Cancers (Basel), 2021. **13**(5).
51. Plate, K.H., et al., *Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms*. Int J Cancer, 1994. **59**(4): p. 520-9.
52. Olafson, L.R., et al., *The role of TP53 gain-of-function mutation in multifocal glioblastoma*. J Neurooncol, 2020. **147**(1): p. 37-47.
53. Ham, S.W., et al., *TP53 gain-of-function mutation promotes inflammation in glioblastoma*. Cell Death Differ, 2019. **26**(3): p. 409-425.
54. Haque, A., N.L. Banik, and S.K. Ray, *Molecular alterations in glioblastoma: potential targets for immunotherapy*. Prog Mol Biol Transl Sci, 2011. **98**: p. 187-234.
55. Zhang, P., et al., *Current Opinion on Molecular Characterization for GBM Classification in Guiding Clinical Diagnosis, Prognosis, and Therapy*. Front Mol Biosci, 2020. **7**: p. 562798.
56. Hatanpaa, K.J., et al., *Epidermal growth factor receptor in glioma: signal transduction, neuropathology, imaging, and radioresistance*. Neoplasia, 2010. **12**(9): p. 675-84.
57. Park, J., et al., *Transcriptome profiling-based identification of prognostic subtypes and multi-omics signatures of glioblastoma*. Sci Rep, 2019. **9**(1): p. 10555.
58. Rana, R., et al., *Exploring the role of epidermal growth factor receptor variant III in meningeal tumors*. PLoS One, 2021. **16**(9): p. e0255133.
59. Takano, S., et al., *Immunohistochemistry on IDH 1/2, ATRX, p53 and Ki-67 substitute molecular genetic testing and predict patient prognosis in grade III adult diffuse gliomas*. Brain Tumor Pathol, 2016. **33**(2): p. 107-16.
60. Cerami, E., et al., *The cBio cancer genomics portal: an open platform for exploring multidimensional cancer genomics data*. Cancer Discov, 2012. **2**(5): p. 401-4.
61. Scheer, M., et al., *Neurofibromatosis Type 1 Gene Alterations Define Specific Features of a Subset of Glioblastomas*. Int J Mol Sci, 2021. **23**(1).
62. Yan, H., et al., *IDH1 and IDH2 mutations in gliomas*. N Engl J Med, 2009. **360**(8): p. 765-73.
63. Becker, A.P., et al., *Tumor Heterogeneity in Glioblastomas: From Light Microscopy to Molecular Pathology*. Cancers (Basel), 2021. **13**(4).
64. Tomczak, K., P. Czerwinska, and M. Wiznerowicz, *The Cancer Genome Atlas (TCGA): an immeasurable source of knowledge*. Contemp Oncol (Pozn), 2015. **19**(1A): p. A68-77.

65. Verhaak, R.G., et al., *Integrated genomic analysis identifies clinically relevant subtypes of glioblastoma characterized by abnormalities in PDGFRA, IDH1, EGFR, and NF1*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(1): p. 98-110.
66. Wang, Q., et al., *Tumor Evolution of Glioma-Intrinsic Gene Expression Subtypes Associates with Immunological Changes in the Microenvironment*. *Cancer Cell*, 2017. **32**(1): p. 42-56 e6.
67. Sidaway, P., *CNS cancer: Glioblastoma subtypes revisited*. *Nat Rev Clin Oncol*, 2017. **14**(10): p. 587.
68. Jankowska, S., et al., *Molecular classification of glioblastoma based on immunohistochemical expression of EGFR, PDGFRA, NF1, IDH1, p53 and PTEN proteins*. *Pol J Pathol*, 2021. **72**(1): p. 1-10.
69. Herrera-Oropeza, G.E., et al., *Glioblastoma multiforme: a multi-omics analysis of driver genes and tumour heterogeneity*. *Interface Focus*, 2021. **11**(4): p. 20200072.
70. Etcheverry, A., et al., *DNA methylation in glioblastoma: impact on gene expression and clinical outcome*. *BMC Genomics*, 2010. **11**: p. 701.
71. Christensen, B.C., et al., *DNA methylation, isocitrate dehydrogenase mutation, and survival in glioma*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(2): p. 143-53.
72. Brennan, C., et al., *Glioblastoma subclasses can be defined by activity among signal transduction pathways and associated genomic alterations*. *PLoS One*, 2009. **4**(11): p. e7752.
73. Parsons, D.W., et al., *An integrated genomic analysis of human glioblastoma multiforme*. *Science*, 2008. **321**(5897): p. 1807-12.
74. Skiriute, D., et al., *MGMT, GATA6, CD81, DR4, and CASP8 gene promoter methylation in glioblastoma*. *BMC Cancer*, 2012. **12**: p. 218.
75. Noushmehr, H., et al., *Identification of a CpG island methylator phenotype that defines a distinct subgroup of glioma*. *Cancer Cell*, 2010. **17**(5): p. 510-22.
76. Neftel, C., et al., *An Integrative Model of Cellular States, Plasticity, and Genetics for Glioblastoma*. *Cell*, 2019. **178**(4): p. 835-849 e21.
77. Goenka, A., et al., *The Role of Non-Coding RNAs in Glioma*. *Biomedicines*, 2022. **10**(8).
78. DeOcesano-Pereira, C., et al., *Emerging Roles and Potential Applications of Non-Coding RNAs in Glioblastoma*. *Int J Mol Sci*, 2020. **21**(7).
79. Whiteside, T.L., *The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth*. *Oncogene*, 2008. **27**(45): p. 5904-12.
80. Balkwill, F.R., M. Capasso, and T. Hagemann, *The tumor microenvironment at a glance*. *J Cell Sci*, 2012. **125**(Pt 23): p. 5591-6.
81. Darmanis, S., et al., *Single-Cell RNA-Seq Analysis of Infiltrating Neoplastic Cells at the Migrating Front of Human Glioblastoma*. *Cell Rep*, 2017. **21**(5): p. 1399-1410.
82. Gabrusiewicz, K., et al., *Glioblastoma-infiltrated innate immune cells resemble M0 macrophage phenotype*. *JCI Insight*, 2016. **1**(2).
83. Shi, Y., et al., *Hostile takeover: glioma stem cells recruit TAMs to support tumor progression*. *Cell Stem Cell*, 2015. **16**(3): p. 219-20.
84. Henrik Heiland, D., et al., *Tumor-associated reactive astrocytes aid the evolution of immunosuppressive environment in glioblastoma*. *Nat Commun*, 2019. **10**(1): p. 2541.
85. Engler, J.R., et al., *Increased microglia/macrophage gene expression in a subset of adult and pediatric astrocytomas*. *PLoS One*, 2012. **7**(8): p. e43339.
86. Pan, Y., et al., *Tumor-Associated Macrophages in Tumor Immunity*. *Front Immunol*, 2020. **11**: p. 583084.
87. Tan, Y., et al., *Tumor-Associated Macrophages: A Potential Target for Cancer Therapy*. *Front Oncol*, 2021. **11**: p. 693517.

88. Mi, Y., et al., *The Emerging Role of Myeloid-Derived Suppressor Cells in the Glioma Immune Suppressive Microenvironment*. Front Immunol, 2020. **11**: p. 737.
89. Fortin, C., X. Huang, and Y. Yang, *NK cell response to vaccinia virus is regulated by myeloid-derived suppressor cells*. J Immunol, 2012. **189**(4): p. 1843-9.
90. Chongsathidkiet, P., et al., *Sequestration of T cells in bone marrow in the setting of glioblastoma and other intracranial tumors*. Nat Med, 2018. **24**(9): p. 1459-1468.
91. Yang, T., Z. Kong, and W. Ma, *PD-1/PD-L1 immune checkpoint inhibitors in glioblastoma: clinical studies, challenges and potential*. Hum Vaccin Immunother, 2021. **17**(2): p. 546-553.
92. Aponte, P.M. and A. Caicedo, *Stemness in Cancer: Stem Cells, Cancer Stem Cells, and Their Microenvironment*. Stem Cells Int, 2017. **2017**: p. 5619472.
93. Krusche, B., et al., *EphrinB2 drives perivascular invasion and proliferation of glioblastoma stem-like cells*. Elife, 2016. **5**.
94. Binda, E., et al., *Wnt5a Drives an Invasive Phenotype in Human Glioblastoma Stem-like Cells*. Cancer Res, 2017. **77**(4): p. 996-1007.
95. Chen, J., et al., *A restricted cell population propagates glioblastoma growth after chemotherapy*. Nature, 2012. **488**(7412): p. 522-6.
96. Tang, X., et al., *Targeting Glioblastoma Stem Cells: A Review on Biomarkers, Signal Pathways and Targeted Therapy*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 701291.
97. Alves, A.L.V., et al., *Role of glioblastoma stem cells in cancer therapeutic resistance: a perspective on antineoplastic agents from natural sources and chemical derivatives*. Stem Cell Res Ther, 2021. **12**(1): p. 206.
98. Mattei, V., et al., *The Importance of Tumor Stem Cells in Glioblastoma Resistance to Therapy*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(8).
99. Karbanova, J., et al., *The stem cell marker CD133 (Prominin-1) is expressed in various human glandular epithelia*. J Histochem Cytochem, 2008. **56**(11): p. 977-93.
100. Charles, N. and E.C. Holland, *The perivascular niche microenvironment in brain tumor progression*. Cell Cycle, 2010. **9**(15): p. 3012-21.
101. Anderson, N.M. and M.C. Simon, *The tumor microenvironment*. Curr Biol, 2020. **30**(16): p. R921-R925.
102. Zhu, T.S., et al., *Endothelial cells create a stem cell niche in glioblastoma by providing NOTCH ligands that nurture self-renewal of cancer stem-like cells*. Cancer Res, 2011. **71**(18): p. 6061-72.
103. Bao, S., et al., *Stem cell-like glioma cells promote tumor angiogenesis through vascular endothelial growth factor*. Cancer Res, 2006. **66**(16): p. 7843-8.
104. Lathia, J.D., et al., *Integrin alpha 6 regulates glioblastoma stem cells*. Cell Stem Cell, 2010. **6**(5): p. 421-32.
105. Galan-Moya, E.M., et al., *Secreted factors from brain endothelial cells maintain glioblastoma stem-like cell expansion through the mTOR pathway*. EMBO Rep, 2011. **12**(5): p. 470-6.
106. Li, Z., et al., *Hypoxia-inducible factors regulate tumorigenic capacity of glioma stem cells*. Cancer Cell, 2009. **15**(6): p. 501-13.
107. Seidel, S., et al., *A hypoxic niche regulates glioblastoma stem cells through hypoxia inducible factor 2 alpha*. Brain, 2010. **133**(Pt 4): p. 983-95.
108. Brat, D.J. and E.G. Van Meir, *Glomeruloid microvascular proliferation orchestrated by VPF/VEGF: a new world of angiogenesis research*. Am J Pathol, 2001. **158**(3): p. 789-96.
109. Rong, Y., et al., *'Pseudopalisading' necrosis in glioblastoma: a familiar morphologic feature that links vascular pathology, hypoxia, and angiogenesis*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(6): p. 529-39.

110. Bar, E.E., et al., *Hypoxia increases the expression of stem-cell markers and promotes clonogenicity in glioblastoma neurospheres*. Am J Pathol, 2010. **177**(3): p. 1491-502.
111. Domenech, M., et al., *Hypoxia: The Cornerstone of Glioblastoma*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(22).
112. Monteiro, A.R., et al., *The Role of Hypoxia in Glioblastoma Invasion*. Cells, 2017. **6**(4).
113. Yang, L., et al., *Hypoxia and hypoxia-inducible factors in glioblastoma multiforme progression and therapeutic implications*. Exp Cell Res, 2012. **318**(19): p. 2417-26.
114. Kaur, B., et al., *Hypoxia and the hypoxia-inducible-factor pathway in glioma growth and angiogenesis*. Neuro Oncol, 2005. **7**(2): p. 134-53.
115. Yang, W., et al., *Knockdown of miR-210 decreases hypoxic glioma stem cells stemness and radioresistance*. Exp Cell Res, 2014. **326**(1): p. 22-35.
116. Jawhari, S., M.H. Ratinaud, and M. Verdier, *Glioblastoma, hypoxia and autophagy: a survival-prone 'menage-a-trois'*. Cell Death Dis, 2016. **7**(10): p. e2434.
117. Sotelo, J., E. Briceno, and M.A. Lopez-Gonzalez, *Adding chloroquine to conventional treatment for glioblastoma multiforme: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial*. Ann Intern Med, 2006. **144**(5): p. 337-43.
118. Muller Bark, J., et al., *Circulating biomarkers in patients with glioblastoma*. Br J Cancer, 2020. **122**(3): p. 295-305.
119. Oliveira, F.D., M. Castanho, and V. Neves, *Exosomes and Brain Metastases: A Review on Their Role and Potential Applications*. Int J Mol Sci, 2021. **22**(19).
120. Shi, J., et al., *Role of Exosomes in the Progression, Diagnosis, and Treatment of Gliomas*. Med Sci Monit, 2020. **26**: p. e924023.
121. Wu, X., et al., *The Roles of Exosomes as Future Therapeutic Agents and Diagnostic Tools for Glioma*. Front Oncol, 2021. **11**: p. 733529.
122. Shao, H., et al., *Chip-based analysis of exosomal mRNA mediating drug resistance in glioblastoma*. Nat Commun, 2015. **6**: p. 6999.
123. Quezada, C., et al., *Role of extracellular vesicles in glioma progression*. Mol Aspects Med, 2018. **60**: p. 38-51.
124. Xie, Q.H., et al., *Exosome-Mediated Immunosuppression in Tumor Microenvironments*. Cells, 2022. **11**(12).
125. Yekula, A., et al., *Extracellular Vesicles in Glioblastoma Tumor Microenvironment*. Front Immunol, 2019. **10**: p. 3137.
126. Al-Nedawi, K., et al., *Intercellular transfer of the oncogenic receptor EGFRvIII by microvesicles derived from tumour cells*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(5): p. 619-24.
127. Setti, M., et al., *Extracellular vesicle-mediated transfer of CLIC1 protein is a novel mechanism for the regulation of glioblastoma growth*. Oncotarget, 2015. **6**(31): p. 31413-27.
128. Skog, J., et al., *Glioblastoma microvesicles transport RNA and proteins that promote tumour growth and provide diagnostic biomarkers*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(12): p. 1470-6.
129. Chistiakov, D.A. and V.P. Chekhonin, *Extracellular vesicles shed by glioma cells: pathogenic role and clinical value*. Tumour Biol, 2014. **35**(9): p. 8425-38.
130. Yin, J., et al., *Exosomal transfer of miR-1238 contributes to temozolomide-resistance in glioblastoma*. EBioMedicine, 2019. **42**: p. 238-251.
131. Tamai, S., T. Ichinose, and M. Nakada, *Liquid biomarkers in glioma*. Brain Tumor Pathol, 2023. **40**(2): p. 66-77.
132. Kopkova, A., et al., *Cerebrospinal fluid microRNAs as diagnostic biomarkers in brain tumors*. Clin Chem Lab Med, 2018. **56**(6): p. 869-879.
133. Jadoon, S.S., et al., *Genomic and Epigenomic Features of Glioblastoma Multiforme and its Biomarkers*. J Oncol, 2022. **2022**: p. 4022960.

134. Osti, D., et al., *Clinical Significance of Extracellular Vesicles in Plasma from Glioblastoma Patients*. Clin Cancer Res, 2019. **25**(1): p. 266-276.
135. Kazimierczyk, M., et al., *Human Long Noncoding RNA Interactome: Detection, Characterization and Function*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(3).
136. Mattick, J.S. and I.V. Makunin, *Non-coding RNA*. Hum Mol Genet, 2006. **15 Spec No 1**: p. R17-29.
137. Latowska, J., et al., *Non-coding RNAs in Brain Tumors, the Contribution of lncRNAs, circRNAs, and snoRNAs to Cancer Development-Their Diagnostic and Therapeutic Potential*. Int J Mol Sci, 2020. **21**(19).
138. Yu, H., et al., *Knockdown of long non-coding RNA XIST increases blood-tumor barrier permeability and inhibits glioma angiogenesis by targeting miR-137*. Oncogenesis, 2017. **6**(3): p. e303.
139. Zhao, H., et al., *The lncRNA H19 interacts with miR-140 to modulate glioma growth by targeting iASPP*. Arch Biochem Biophys, 2016. **610**: p. 1-7.
140. Zhang, K., et al., *Long non-coding RNA HOTAIR promotes glioblastoma cell cycle progression in an EZH2 dependent manner*. Oncotarget, 2015. **6**(1): p. 537-46.
141. Wang, R., et al., *EIF4A3-induced circular RNA MMP9 (circMMP9) acts as a sponge of miR-124 and promotes glioblastoma multiforme cell tumorigenesis*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 166.
142. Wei, Y., et al., *EIF4A3-induced circular RNA ASAP1 promotes tumorigenesis and temozolomide resistance of glioblastoma via NRAS/MEK1/ERK1-2 signaling*. Neuro Oncol, 2021. **23**(4): p. 611-624.
143. Chan, J.A., A.M. Krichevsky, and K.S. Kosik, *MicroRNA-21 is an antiapoptotic factor in human glioblastoma cells*. Cancer Res, 2005. **65**(14): p. 6029-33.
144. Gaur, A.B., et al., *Downregulation of Pcd4 by mir-21 facilitates glioblastoma proliferation in vivo*. Neuro Oncol, 2011. **13**(6): p. 580-90.
145. Li, Y., et al., *MicroRNA-21 targets LRRFIP1 and contributes to VM-26 resistance in glioblastoma multiforme*. Brain Res, 2009. **1286**: p. 13-8.
146. Shi, L., et al., *MiR-21 protected human glioblastoma U87MG cells from chemotherapeutic drug temozolomide induced apoptosis by decreasing Bax/Bcl-2 ratio and caspase-3 activity*. Brain Res, 2010. **1352**: p. 255-64.
147. Sun, L., et al., *MicroRNA-10b induces glioma cell invasion by modulating MMP-14 and uPAR expression via HOXD10*. Brain Res, 2011. **1389**: p. 9-18.
148. Teplyuk, N.M., et al., *MicroRNA-10b inhibition reduces E2F1-mediated transcription and miR-15/16 activity in glioblastoma*. Oncotarget, 2015. **6**(6): p. 3770-83.
149. Guessous, F., et al., *Oncogenic effects of miR-10b in glioblastoma stem cells*. J Neurooncol, 2013. **112**(2): p. 153-63.
150. Fang, L., et al., *MicroRNA miR-93 promotes tumor growth and angiogenesis by targeting integrin-beta8*. Oncogene, 2011. **30**(7): p. 806-21.
151. Huang, T., et al., *MIR93 (microRNA -93) regulates tumorigenicity and therapy response of glioblastoma by targeting autophagy*. Autophagy, 2019. **15**(6): p. 1100-1111.
152. Sasayama, T., et al., *MicroRNA-10b is overexpressed in malignant glioma and associated with tumor invasive factors, uPAR and RhoC*. Int J Cancer, 2009. **125**(6): p. 1407-13.
153. Wuchty, S., et al., *Prediction of Associations between microRNAs and Gene Expression in Glioma Biology*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e14681.
154. Kefas, B., et al., *microRNA-7 inhibits the epidermal growth factor receptor and the Akt pathway and is down-regulated in glioblastoma*. Cancer Res, 2008. **68**(10): p. 3566-72.
155. Li, Y., et al., *MicroRNA-34a inhibits glioblastoma growth by targeting multiple oncogenes*. Cancer Res, 2009. **69**(19): p. 7569-76.

156. Shi, Z.M., et al., *MiR-128 inhibits tumor growth and angiogenesis by targeting p70S6K1*. PLoS One, 2012. **7**(3): p. e32709.
157. Teplyuk, N.M., et al., *MicroRNAs in cerebrospinal fluid identify glioblastoma and metastatic brain cancers and reflect disease activity*. Neuro Oncol, 2012. **14**(6): p. 689-700.
158. Baraniskin, A., et al., *Identification of microRNAs in the cerebrospinal fluid as biomarker for the diagnosis of glioma*. Neuro Oncol, 2012. **14**(1): p. 29-33.
159. Akers, J.C., et al., *A cerebrospinal fluid microRNA signature as biomarker for glioblastoma*. Oncotarget, 2017. **8**(40): p. 68769-68779.
160. Kopkova, A., et al., *Cerebrospinal Fluid MicroRNA Signatures as Diagnostic Biomarkers in Brain Tumors*. Cancers (Basel), 2019. **11**(10).
161. Wang, J., F. Che, and J. Zhang, *Cell-free microRNAs as non-invasive biomarkers in glioma: a diagnostic meta-analysis*. Int J Biol Markers, 2019. **34**(3): p. 232-242.
162. Swellam, M., et al., *Clinical impact of circulating oncogenic MiRNA-221 and MiRNA-222 in glioblastoma multiforme*. J Neurooncol, 2019. **144**(3): p. 545-551.
163. Zhi, F., et al., *Identification of 9 serum microRNAs as potential noninvasive biomarkers of human astrocytoma*. Neuro Oncol, 2015. **17**(3): p. 383-91.
164. Zhao, H., et al., *Serum microRNA profiling in patients with glioblastoma: a survival analysis*. Mol Cancer, 2017. **16**(1): p. 59.
165. Shen, J., et al., *Serum HOTAIR and GAS5 levels as predictors of survival in patients with glioblastoma*. Mol Carcinog, 2018. **57**(1): p. 137-141.
166. Tan, S.K., et al., *Serum long noncoding RNA HOTAIR as a novel diagnostic and prognostic biomarker in glioblastoma multiforme*. Mol Cancer, 2018. **17**(1): p. 74.
167. Santangelo, A., et al., *A microRNA signature from serum exosomes of patients with glioma as complementary diagnostic biomarker*. J Neurooncol, 2018. **136**(1): p. 51-62.
168. Manterola, L., et al., *A small noncoding RNA signature found in exosomes of GBM patient serum as a diagnostic tool*. Neuro Oncol, 2014. **16**(4): p. 520-7.
169. Ebrahimkhani, S., et al., *Deep sequencing of circulating exosomal microRNA allows non-invasive glioblastoma diagnosis*. NPJ Precis Oncol, 2018. **2**: p. 28.
170. Lan, F., et al., *Serum exosomal miR-301a as a potential diagnostic and prognostic biomarker for human glioma*. Cell Oncol (Dordr), 2018. **41**(1): p. 25-33.
171. Simionescu, N., et al., *Microvesicles and Microvesicle-Associated microRNAs Reflect Glioblastoma Regression: Microvesicle-Associated miR-625-5p Has Biomarker Potential*. Int J Mol Sci, 2022. **23**(15).
172. Stella, M., et al., *Serum Extracellular Vesicle-Derived circHIPK3 and circSMARCA5 Are Two Novel Diagnostic Biomarkers for Glioblastoma Multiforme*. Pharmaceuticals (Basel), 2021. **14**(7).
173. Kore, R.A., et al., *Hypoxia-derived exosomes induce putative altered pathways in biosynthesis and ion regulatory channels in glioblastoma cells*. Biochem Biophys Rep, 2018. **14**: p. 104-113.
174. Williams, G.T. and F. Farzaneh, *Are snoRNAs and snoRNA host genes new players in cancer?* Nat Rev Cancer, 2012. **12**(2): p. 84-8.
175. Liao, J.Y., et al., *Deep sequencing of human nuclear and cytoplasmic small RNAs reveals an unexpectedly complex subcellular distribution of miRNAs and tRNA 3' trailers*. PLoS One, 2010. **5**(5): p. e10563.
176. Ganot, P., M. Caizergues-Ferrer, and T. Kiss, *The family of box ACA small nucleolar RNAs is defined by an evolutionarily conserved secondary structure and ubiquitous sequence elements essential for RNA accumulation*. Genes Dev, 1997. **11**(7): p. 941-56.

177. Balakin, A.G., L. Smith, and M.J. Fournier, *The RNA world of the nucleolus: two major families of small RNAs defined by different box elements with related functions*. Cell, 1996. **86**(5): p. 823-34.
178. Dupuis-Sandoval, F., M. Poirier, and M.S. Scott, *The emerging landscape of small nucleolar RNAs in cell biology*. Wiley Interdiscip Rev RNA, 2015. **6**(4): p. 381-97.
179. Jorjani, H., et al., *An updated human snoRNAome*. Nucleic Acids Res, 2016. **44**(11): p. 5068-82.
180. Dieci, G., M. Preti, and B. Montanini, *Eukaryotic snoRNAs: a paradigm for gene expression flexibility*. Genomics, 2009. **94**(2): p. 83-8.
181. Edouard Bertrand, M.J.F., *The snoRNPs and Related Machines: Ancient Devices That Mediate Maturation of rRNA and Other RNAs*. 2000-2013, In: Madame Curie Bioscience Database [Internet], Austin (TX): Landes Bioscience.
182. Filipowicz, W. and V. Pogacic, *Biogenesis of small nucleolar ribonucleoproteins*. Curr Opin Cell Biol, 2002. **14**(3): p. 319-27.
183. Falaleeva, M. and S. Stamm, *Processing of snoRNAs as a new source of regulatory non-coding RNAs: snoRNA fragments form a new class of functional RNAs*. Bioessays, 2013. **35**(1): p. 46-54.
184. Reichow, S.L., et al., *The structure and function of small nucleolar ribonucleoproteins*. Nucleic Acids Res, 2007. **35**(5): p. 1452-64.
185. Dsouza, V.L., et al., *Small nucleolar RNA and its potential role in breast cancer - A comprehensive review*. Biochim Biophys Acta Rev Cancer, 2021. **1875**(1): p. 188501.
186. Abel, Y. and M. Rederstorff, *SnoRNAs and the emerging class of sdRNAs: Multifaceted players in oncogenesis*. Biochimie, 2019. **164**: p. 17-21.
187. Cavaille, J., M. Nicoloso, and J.P. Bachellerie, *Targeted ribose methylation of RNA in vivo directed by tailored antisense RNA guides*. Nature, 1996. **383**(6602): p. 732-5.
188. Huang, Z.H., et al., *snoRNAs: functions and mechanisms in biological processes, and roles in tumor pathophysiology*. Cell Death Discov, 2022. **8**(1): p. 259.
189. Vitali, P. and T. Kiss, *Cooperative 2'-O-methylation of the wobble cytidine of human elongator tRNA(Met)(CAT) by a nucleolar and a Cajal body-specific box C/D RNP*. Genes Dev, 2019. **33**(13-14): p. 741-746.
190. Sharma, S., et al., *Specialized box C/D snoRNPs act as antisense guides to target RNA base acetylation*. PLoS Genet, 2017. **13**(5): p. e1006804.
191. Huang, C., et al., *A snoRNA modulates mRNA 3' end processing and regulates the expression of a subset of mRNAs*. Nucleic Acids Res, 2017. **45**(15): p. 8647-8660.
192. Ono, M., et al., *Analysis of human small nucleolar RNAs (snoRNA) and the development of snoRNA modulator of gene expression vectors*. Mol Biol Cell, 2010. **21**(9): p. 1569-84.
193. Hock, J., et al., *Proteomic and functional analysis of Argonaute-containing mRNA-protein complexes in human cells*. EMBO Rep, 2007. **8**(11): p. 1052-60.
194. Kishore, S. and S. Stamm, *The snoRNA HBII-52 regulates alternative splicing of the serotonin receptor 2C*. Science, 2006. **311**(5758): p. 230-2.
195. Lykke-Andersen, S., et al., *Box C/D snoRNP Autoregulation by a cis-Acting snoRNA in the NOP56 Pre-mRNA*. Mol Cell, 2018. **72**(1): p. 99-111 e5.
196. Han, C., et al., *Chromatin-associated orphan snoRNA regulates DNA damage-mediated differentiation via a non-canonical complex*. Cell Rep, 2022. **38**(13): p. 110421.
197. van der Werf, J., C.V. Chin, and N.I. Fleming, *SnoRNA in Cancer Progression, Metastasis and Immunotherapy Response*. Biology (Basel), 2021. **10**(8).
198. Xu, B., et al., *SNORD47, a box C/D snoRNA, suppresses tumorigenesis in glioblastoma*. Oncotarget, 2017. **8**(27): p. 43953-43966.

199. Chen, L., et al., *SNORD76, a box C/D snoRNA, acts as a tumor suppressor in glioblastoma*. *Sci Rep*, 2015. **5**: p. 8588.
200. Cui, C., et al., *NOP10 predicts lung cancer prognosis and its associated small nucleolar RNAs drive proliferation and migration*. *Oncogene*, 2021. **40**(5): p. 909-921.
201. Zheng, D., et al., *Small nucleolar RNA 78 promotes the tumorigenesis in non-small cell lung cancer*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2015. **34**(1): p. 49.
202. Tang, G., et al., *Small Nucleolar RNA 71A Promotes Lung Cancer Cell Proliferation, Migration and Invasion via MAPK/ERK Pathway*. *J Cancer*, 2019. **10**(10): p. 2261-2275.
203. Liu, Y., et al., *SNORD1C maintains stemness and 5-FU resistance by activation of Wnt signaling pathway in colorectal cancer*. *Cell Death Discov*, 2022. **8**(1): p. 200.
204. Wu, H., et al., *Long noncoding RNA ZFAS1 promoting small nucleolar RNA-mediated 2'-O-methylation via NOP58 recruitment in colorectal cancer*. *Mol Cancer*, 2020. **19**(1): p. 95.
205. Yoshida, K., et al., *SNORA21 - An Oncogenic Small Nucleolar RNA, with a Prognostic Biomarker Potential in Human Colorectal Cancer*. *EBioMedicine*, 2017. **22**: p. 68-77.
206. Zhang, C., et al., *C/D-Box Snord105b Promotes Tumorigenesis in Gastric Cancer via ALDOA/C-Myc Pathway*. *Cell Physiol Biochem*, 2018. **45**(6): p. 2471-2482.
207. Liu, C.X., et al., *The SNORA21 expression is upregulated and acts as a novel independent indicator in human gastric cancer prognosis*. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018. **22**(17): p. 5519-5524.
208. Pacilli, A., et al., *SnoRNA U50 levels are regulated by cell proliferation and rRNA transcription*. *Int J Mol Sci*, 2013. **14**(7): p. 14923-35.
209. Duan, S., et al., *SNORA71B promotes breast cancer cells across blood-brain barrier by inducing epithelial-mesenchymal transition*. *Breast Cancer*, 2020. **27**(6): p. 1072-1081.
210. Sun, Y., et al., *H/ACA box small nucleolar RNA 7B acts as an oncogene and a potential prognostic biomarker in breast cancer*. *Cancer Cell Int*, 2019. **19**: p. 125.
211. Li, C., et al., *The C/D box small nucleolar RNA SNORD52 regulated by Upf1 facilitates Hepatocarcinogenesis by stabilizing CDK1*. *Theranostics*, 2020. **10**(20): p. 9348-9363.
212. Wang, G., et al., *Small nucleolar RNA 42 promotes the growth of hepatocellular carcinoma through the p53 signaling pathway*. *Cell Death Discov*, 2021. **7**(1): p. 347.
213. Liu, Z., et al., *SNORA23 inhibits HCC tumorigenesis by impairing the 2'-O-ribose methylation level of 28S rRNA*. *Cancer Biol Med*, 2021. **19**(1): p. 104-19.
214. Zhang, L., et al., *SNORA72 Activates the Notch1/c-Myc Pathway to Promote Stemness Transformation of Ovarian Cancer Cells*. *Front Cell Dev Biol*, 2020. **8**: p. 583087.
215. Zhu, W., et al., *SNORD89 promotes stemness phenotype of ovarian cancer cells by regulating Notch1-c-Myc pathway*. *J Transl Med*, 2019. **17**(1): p. 259.
216. Valleron, W., et al., *Specific small nucleolar RNA expression profiles in acute leukemia*. *Leukemia*, 2012. **26**(9): p. 2052-60.
217. Taft, R.J., et al., *Small RNAs derived from snoRNAs*. *RNA*, 2009. **15**(7): p. 1233-40.
218. Ono, M., et al., *Identification of human miRNA precursors that resemble box C/D snoRNAs*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(9): p. 3879-91.
219. Scott, M.S., et al., *Human miRNA precursors with box H/ACA snoRNA features*. *PLoS Comput Biol*, 2009. **5**(9): p. e1000507.
220. Yu, F., et al., *p53 Represses the Oncogenic Sno-MiR-28 Derived from a SnoRNA*. *PLoS One*, 2015. **10**(6): p. e0129190.
221. Krol, J., I. Loedige, and W. Filipowicz, *The widespread regulation of microRNA biogenesis, function and decay*. *Nat Rev Genet*, 2010. **11**(9): p. 597-610.

222. Godang, N.L., et al., *Global Switch from DICER-dependent MicroRNA to DICER-independent SnoRNA-derived RNA Biogenesis in Malignancy*. *MicroPubl Biol*, 2023. **2023**.
223. Ender, C., et al., *A human snoRNA with microRNA-like functions*. *Mol Cell*, 2008. **32**(4): p. 519-28.
224. Macias, S., et al., *DGCR8 HITS-CLIP reveals novel functions for the Microprocessor*. *Nat Struct Mol Biol*, 2012. **19**(8): p. 760-6.
225. Logan, M.K., D.M. McLaurin, and M.D. Hebert, *Synergistic interactions between Cajal bodies and the miRNA processing machinery*. *Mol Biol Cell*, 2020. **31**(15): p. 1561-1569.
226. McLaurin, D.M., et al., *Molecular determinants that govern scaRNA processing by Drosha/DGCR8*. *Biol Open*, 2020. **9**(10).
227. Yang, J.S. and E.C. Lai, *Dicer-independent, Ago2-mediated microRNA biogenesis in vertebrates*. *Cell Cycle*, 2010. **9**(22): p. 4455-60.
228. Hock, J. and G. Meister, *The Argonaute protein family*. *Genome Biol*, 2008. **9**(2): p. 210.
229. Johnson, K.C., et al., *Nuclear Localization of Argonaute is affected by Cell Density and May Relieve Repression by microRNAs*. *bioRxiv*, 2023.
230. *AGO2 localizes to the nucleus in quiescence and represses transposon expression*. *Nat Struct Mol Biol*, 2023. **30**(12): p. 1838-1839.
231. Griffin, K.N., et al., *Widespread association of the Argonaute protein AGO2 with meiotic chromatin suggests a distinct nuclear function in mammalian male reproduction*. *Genome Res*, 2022. **32**(9): p. 1655-68.
232. Sala, L., et al., *AGO2 silences mobile transposons in the nucleus of quiescent cells*. *Nat Struct Mol Biol*, 2023. **30**(12): p. 1985-1995.
233. Cheloufi, S., et al., *A dicer-independent miRNA biogenesis pathway that requires Ago catalysis*. *Nature*, 2010. **465**(7298): p. 584-9.
234. Zhong, C., Y. Yang, and S. Yooseph, *GRASP: guided reference-based assembly of short peptides*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(3): p. e18.
235. Scott, M.S., et al., *Human box C/D snoRNA processing conservation across multiple cell types*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(8): p. 3676-88.
236. Smith, C.M. and J.A. Steitz, *Classification of gas5 as a multi-small-nucleolar-RNA (snoRNA) host gene and a member of the 5'-terminal oligopyrimidine gene family reveals common features of snoRNA host genes*. *Mol Cell Biol*, 1998. **18**(12): p. 6897-909.
237. Chen, C., et al., *Fused in Sarcoma: Properties, Self-Assembly and Correlation with Neurodegenerative Diseases*. *Molecules*, 2019. **24**(8).
238. Gawade, K., et al., *FUS regulates a subset of snoRNA expression and modulates the level of rRNA modifications*. *Sci Rep*, 2023. **13**(1): p. 2974.
239. Morlando, M., et al., *FUS stimulates microRNA biogenesis by facilitating co-transcriptional Drosha recruitment*. *EMBO J*, 2012. **31**(24): p. 4502-10.
240. Agrawal, N., et al., *RNA interference: biology, mechanism, and applications*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 2003. **67**(4): p. 657-85.
241. Xiao, J., et al., *miR-605 joins p53 network to form a p53:miR-605:Mdm2 positive feedback loop in response to stress*. *EMBO J*, 2011. **30**(3): p. 524-32.
242. Chen, L., et al., *MicroRNA-605 functions as a tumor suppressor by targeting INPP4B in melanoma*. *Oncol Rep*, 2017. **38**(2): p. 1276-1286.
243. Zhou, Y.J., et al., *Down-regulation of miR-605 promotes the proliferation and invasion of prostate cancer cells by up-regulating EN2*. *Life Sci*, 2017. **190**: p. 7-14.

244. Zhao, L., et al., *Bioinformatics analysis of potential glioblastoma circular RNA sponge network*. *Transl Cancer Res*, 2022. **11**(5): p. 1017-1032.
245. Fazi, B., et al., *The transcriptome and miRNome profiling of glioblastoma tissues and peritumoral regions highlights molecular pathways shared by tumors and surrounding areas and reveals differences between short-term and long-term survivors*. *Oncotarget*, 2015. **6**(26): p. 22526-52.
246. Nwokwu, C.D., et al., *Identification of microRNA-mRNA regulatory network associated with oxidative DNA damage in human astrocytes*. *ASN Neuro*, 2022. **14**: p. 17590914221101704.
247. Wang, C., et al., *Hsa-miR-1248 suppressed the proliferation, invasion and migration of colorectal cancer cells via inhibiting PSMD10*. *BMC Cancer*, 2022. **22**(1): p. 922.
248. Kishore, S., et al., *Insights into snoRNA biogenesis and processing from PAR-CLIP of snoRNA core proteins and small RNA sequencing*. *Genome Biol*, 2013. **14**(5): p. R45.
249. Matera, A.G., R.M. Terns, and M.P. Terns, *Non-coding RNAs: lessons from the small nuclear and small nucleolar RNAs*. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2007. **8**(3): p. 209-20.
250. Muller, S., et al., *Next-generation sequencing reveals novel differentially regulated mRNAs, lncRNAs, miRNAs, sdRNAs and a piRNA in pancreatic cancer*. *Mol Cancer*, 2015. **14**: p. 94.
251. Chow, R.D. and S. Chen, *Sno-derived RNAs are prevalent molecular markers of cancer immunity*. *Oncogene*, 2018. **37**(50): p. 6442-6462.
252. Patterson, D.G., et al., *Human snoRNA-93 is processed into a microRNA-like RNA that promotes breast cancer cell invasion*. *NPJ Breast Cancer*, 2017. **3**: p. 25.
253. Coley, A.B., et al., *MicroRNA-like snoRNA-Derived RNAs (sdRNAs) Promote Castration-Resistant Prostate Cancer*. *Cells*, 2022. **11**(8).
254. Li, H., et al., *miR-664b-5p Inhibits Hepatocellular Cancer Cell Proliferation Through Targeting Oncogene AKT2*. *Cancer Biother Radiopharm*, 2020. **35**(8): p. 605-614.
255. Lv, M., et al., *MicroRNA-664 suppresses the growth of cervical cancer cells via targeting c-Kit*. *Drug Des Devel Ther*, 2019. **13**: p. 2371-2379.
256. Tu, M.J., et al., *MicroRNA-1291 targets the FOXA2-AGR2 pathway to suppress pancreatic cancer cell proliferation and tumorigenesis*. *Oncotarget*, 2016. **7**(29): p. 45547-45561.
257. Tu, M.J., et al., *MicroRNA-1291-5p Sensitizes Pancreatic Carcinoma Cells to Arginine Deprivation and Chemotherapy through the Regulation of Arginolysis and Glycolysis*. *Mol Pharmacol*, 2020. **98**(6): p. 686-694.
258. Yamasaki, T., et al., *Tumor-suppressive microRNA-1291 directly regulates glucose transporter 1 in renal cell carcinoma*. *Cancer Sci*, 2013. **104**(11): p. 1411-9.
259. Cai, Q., et al., *MicroRNA-1291 mediates cell proliferation and tumorigenesis by downregulating MED1 in prostate cancer*. *Oncol Lett*, 2019. **17**(3): p. 3253-3260.
260. Pudova, E.A., et al., *miRNAs expression signature potentially associated with lymphatic dissemination in locally advanced prostate cancer*. *BMC Med Genomics*, 2020. **13**(Suppl 8): p. 129.
261. Catanzaro, G., et al., *MiR-1248: a new prognostic biomarker able to identify supratentorial hemispheric pediatric low-grade gliomas patients associated with progression*. *Biomark Res*, 2022. **10**(1): p. 44.
262. Li, C., et al., *MicroRNA-3651 promotes colorectal cancer cell proliferation through directly repressing T-box transcription factor 1*. *Int J Mol Med*, 2020. **45**(3): p. 956-966.
263. Subramani, A., et al., *The brain microenvironment negatively regulates miRNA-768-3p to promote K-ras expression and lung cancer metastasis*. *Sci Rep*, 2013. **3**: p. 2392.

264. He, X., et al., *An Lnc RNA (GAS5)/SnoRNA-derived piRNA induces activation of TRAIL gene by site-specifically recruiting MLL/COMPASS-like complexes*. *Nucleic Acids Res*, 2015. **43**(7): p. 3712-25.
265. Martens-Uzunova, E.S., et al., *C/D-box snoRNA-derived RNA production is associated with malignant transformation and metastatic progression in prostate cancer*. *Oncotarget*, 2015. **6**(19): p. 17430-44.
266. Friedlander, M.R., et al., *miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades*. *Nucleic Acids Res*, 2012. **40**(1): p. 37-52.
267. Kozomara, A. and S. Griffiths-Jones, *miRBase: integrating microRNA annotation and deep-sequencing data*. *Nucleic Acids Res*, 2011. **39**(Database issue): p. D152-7.
268. Griffiths-Jones, S., et al., *miRBase: microRNA sequences, targets and gene nomenclature*. *Nucleic Acids Res*, 2006. **34**(Database issue): p. D140-4.
269. Piwecka, M., et al., *Comprehensive analysis of microRNA expression profile in malignant glioma tissues*. *Mol Oncol*, 2015. **9**(7): p. 1324-40.
270. Conrad, T. and U.A. Orom, *Cellular Fractionation and Isolation of Chromatin-Associated RNA*. *Methods Mol Biol*, 2017. **1468**: p. 1-9.
271. Vinci, M., et al., *Advances in establishment and analysis of three-dimensional tumor spheroid-based functional assays for target validation and drug evaluation*. *BMC Biol*, 2012. **10**: p. 29.
272. Yang, Y.C., et al., *CLIPdb: a CLIP-seq database for protein-RNA interactions*. *BMC Genomics*, 2015. **16**(1): p. 51.
273. Tang, Z., et al., *GEPIA: a web server for cancer and normal gene expression profiling and interactive analyses*. *Nucleic Acids Res*, 2017. **45**(W1): p. W98-W102.
274. Chen, H.C., et al., *FindAdapt: A python package for fast and accurate adapter detection in small RNA sequencing*. *PLoS Comput Biol*, 2024. **20**(1): p. e1011786.
275. Martin, M., *Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads*. 2011, 2011. **17**(1): p. 3 %J EMBnet.journal.
276. Langmead, B. and S.L. Salzberg, *Fast gapped-read alignment with Bowtie 2*. *Nat Methods*, 2012. **9**(4): p. 357-9.
277. Patro, R., et al., *Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression*. *Nat Methods*, 2017. **14**(4): p. 417-419.
278. Wu, D.C., et al., *Limitations of alignment-free tools in total RNA-seq quantification*. *BMC Genomics*, 2018. **19**(1): p. 510.
279. Love, M.I., W. Huber, and S. Anders, *Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2*. *Genome Biol*, 2014. **15**(12): p. 550.
280. Lawrence, M., R. Gentleman, and V. Carey, *rtracklayer: an R package for interfacing with genome browsers*. *Bioinformatics*, 2009. **25**(14): p. 1841-2.
281. Riemondy, K.A., et al., *valr: Reproducible genome interval analysis in R*. *F1000Res*, 2017. **6**: p. 1025.
282. Naryzhny, S., et al., *Proteome of Glioblastoma-Derived Exosomes as a Source of Biomarkers*. *Biomedicines*, 2020. **8**(7).
283. Zanganeh, S., et al., *The Current Landscape of Glioblastoma Biomarkers in Body Fluids*. *Cancers (Basel)*, 2023. **15**(15).
284. Zambo, B., et al., *Decreased calcium pump expression in human erythrocytes is connected to a minor haplotype in the ATP2B4 gene*. *Cell Calcium*, 2017. **65**: p. 73-79.
285. Xue, C., et al., *Expression and Functional Roles of Eukaryotic Initiation Factor 4A Family Proteins in Human Cancers*. *Front Cell Dev Biol*, 2021. **9**: p. 711965.
286. Engel, K.L., et al., *Mechanisms and consequences of subcellular RNA localization across diverse cell types*. *Traffic*, 2020. **21**(6): p. 404-418.

287. Wang, X. and S. Li, *Protein mislocalization: mechanisms, functions and clinical applications in cancer*. Biochim Biophys Acta, 2014. **1846**(1): p. 13-25.
288. Wu, W., et al., *Hypoxia induces H19 expression through direct and indirect Hif-1 α activity, promoting oncogenic effects in glioblastoma*. Sci Rep, 2017. **7**: p. 45029.
289. Zhang, S., et al., *Long non-coding RNA HOTTIP promotes hypoxia-induced epithelial-mesenchymal transition of malignant glioma by regulating the miR-101/ZEB1 axis*. Biomed Pharmacother, 2017. **95**: p. 711-720.
290. Agrawal, R., et al., *Hypoxic signature of microRNAs in glioblastoma: insights from small RNA deep sequencing*. BMC Genomics, 2014. **15**(1): p. 686.
291. Guo, X., et al., *MiR224-3p inhibits hypoxia-induced autophagy by targeting autophagy-related genes in human glioblastoma cells*. Oncotarget, 2015. **6**(39): p. 41620-37.
292. Sama, R.R., C.L. Ward, and D.A. Bosco, *Functions of FUS/TLS from DNA repair to stress response: implications for ALS*. ASN Neuro, 2014. **6**(4).
293. Fish, L., et al., *Nuclear TARBP2 Drives Oncogenic Dysregulation of RNA Splicing and Decay*. Mol Cell, 2019. **75**(5): p. 967-981 e9.
294. Ule, J., H.W. Hwang, and R.B. Darnell, *The Future of Cross-Linking and Immunoprecipitation (CLIP)*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2018. **10**(8).
295. Wang, H., et al., *Cross-linking, Immunoprecipitation and Proteomic Analysis to Identify Interacting Proteins in Cultured Cells*. Bio Protoc, 2019. **9**(11).
296. Karunakara, S.H., et al., *Novel Insights into MEG3/miR664a-3p/ADH4 Axis and Its Possible Role in Hepatocellular Carcinoma from an in Silico Perspective*. Genes (Basel), 2022. **13**(12).
297. Wang, L., et al., *miR-664a-3p functions as an oncogene by targeting Hippo pathway in the development of gastric cancer*. Cell Prolif, 2019. **52**(3): p. e12567.
298. Zacchini, F., et al., *How snoRNAs can contribute to cancer at multiple levels*. NAR Cancer, 2024. **6**(1): p. zcae005.
299. Gasinska, K., et al., *Small Nucleolar RNAs in Pseudoexfoliation Glaucoma*. Cells, 2022. **11**(17).
300. Xing, L., et al., *Expression scoring of a small-nucleolar-RNA signature identified by machine learning serves as a prognostic predictor for head and neck cancer*. J Cell Physiol, 2020. **235**(11): p. 8071-8084.
301. Li, M.W., et al., *Identification of three small nucleolar RNAs (snoRNAs) as potential prognostic markers in diffuse large B-cell lymphoma*. Cancer Med, 2023. **12**(3): p. 3812-3829.
302. Zhuo, Y., et al., *Targeting SNORA38B attenuates tumorigenesis and sensitizes immune checkpoint blockade in non-small cell lung cancer by remodeling the tumor microenvironment via regulation of GAB2/AKT/mTOR signaling pathway*. J Immunother Cancer, 2022. **10**(5).
303. Song, J., et al., *Clinical significance and prognostic value of small nucleolar RNA SNORA38 in breast cancer*. Front Oncol, 2022. **12**: p. 930024.
304. Yu, L., et al., *Expression of small nucleolar RNA SNORA51 and its clinical significance in hepatocellular carcinoma*. Oncol Lett, 2024. **27**(2): p. 55.
305. Li, S., et al., *The small nucleolar RNA SNORA51 enhances breast cancer stem cell-like properties via the RPL3/NPM1/c-MYC pathway*. Mol Carcinog, 2024. **63**(6): p. 1117-1132.
306. Faucher-Giguere, L., et al., *High-grade ovarian cancer associated H/ACA snoRNAs promote cancer cell proliferation and survival*. NAR Cancer, 2022. **4**(1): p. zcab050.
307. Bofill-De Ros, X., et al., *Flexible pri-miRNA structures enable tunable production of 5' isomiRs*. RNA Biol, 2022. **19**(1): p. 279-289.

308. Herbert, A., A. Hatfield, and L. Lackey, *How does precursor RNA structure influence RNA processing and gene expression?* Biosci Rep, 2023. **43**(3).
309. Kretov, D.A., et al., *Ago2-Dependent Processing Allows miR-451 to Evade the Global MicroRNA Turnover Elicited during Erythropoiesis.* Mol Cell, 2020. **78**(2): p. 317-328 e6.
310. Brameier, M., et al., *Human box C/D snoRNAs with miRNA like functions: expanding the range of regulatory RNAs.* Nucleic Acids Res, 2011. **39**(2): p. 675-86.
311. Lerga, A., et al., *Identification of an RNA binding specificity for the potential splicing factor TLS.* J Biol Chem, 2001. **276**(9): p. 6807-16.
312. Han, J., et al., *The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing.* Genes Dev, 2004. **18**(24): p. 3016-27.
313. Chu, Y., et al., *Argonaute binding within human nuclear RNA and its impact on alternative splicing.* RNA, 2021. **27**(9): p. 991-1003.
314. Ohrt, T., et al., *Intracellular localization and routing of miRNA and RNAi pathway components.* Curr Top Med Chem, 2012. **12**(2): p. 79-88.
315. Szczepanek, J. and A. Tretyn, *MicroRNA-Mediated Regulation of Histone-Modifying Enzymes in Cancer: Mechanisms and Therapeutic Implications.* Biomolecules, 2023. **13**(11).
316. Shi, Y., et al., *Dicer-independent snRNA/snoRNA-derived nuclear RNA 3 regulates tumor-associated macrophage function by epigenetically repressing inducible nitric oxide synthase transcription.* Cancer Commun (Lond), 2021. **41**(2): p. 140-153.
317. Yang, L., et al., *Self-assembled FUS binds active chromatin and regulates gene transcription.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2014. **111**(50): p. 17809-14.
318. Ruano, Y., et al., *Identification of novel candidate target genes in amplicons of Glioblastoma multiforme tumors detected by expression and CGH microarray profiling.* Mol Cancer, 2006. **5**: p. 39.
319. Fafard-Couture, E., et al., *Annotation of snoRNA abundance across human tissues reveals complex snoRNA-host gene relationships.* Genome Biol, 2021. **22**(1): p. 172.
320. McCann, K.L., et al., *H/ACA snoRNA levels are regulated during stem cell differentiation.* Nucleic Acids Res, 2020. **48**(15): p. 8686-8703.
321. Warner, W.A., et al., *Expression profiling of snoRNAs in normal hematopoiesis and AML.* Blood Adv, 2018. **2**(2): p. 151-163.
322. Bergeron, D., et al., *Intronic small nucleolar RNAs regulate host gene splicing through base pairing with their adjacent intronic sequences.* Genome Biol, 2023. **24**(1): p. 160.
323. Schubert, T., et al., *Df31 Protein and snoRNAs Maintain Accessible Higher-Order Structures of Chromatin.* Molecular Cell, 2012. **48**(3): p. 434-444.
324. Ameyar-Zazoua, M., et al., *Argonaute proteins couple chromatin silencing to alternative splicing.* Nat Struct Mol Biol, 2012. **19**(10): p. 998-1004.
325. Wang, J., et al., *Comprehensive characterization of small noncoding RNA profiles in hypoxia-induced pulmonary hypertension (HPH) rat tissues.* iScience, 2024. **27**(2): p. 108815.
326. Metge, B.J., et al., *Hypoxia re-programs 2'-O-Me modifications on ribosomal RNA.* iScience, 2021. **24**(1): p. 102010.
327. Elhamamsy, A.R., et al., *Ribosome Biogenesis: A Central Player in Cancer Metastasis and Therapeutic Resistance.* Cancer Res, 2022. **82**(13): p. 2344-2353.
328. Valleron, W., et al., *Small nucleolar RNA expression profiling identifies potential prognostic markers in peripheral T-cell lymphoma.* Blood, 2012. **120**(19): p. 3997-4005.
329. Gong, J., et al., *A Pan-cancer Analysis of the Expression and Clinical Relevance of Small Nucleolar RNAs in Human Cancer.* Cell Rep, 2017. **21**(7): p. 1968-1981.

330. Chen, M., et al., *Transcriptome and long noncoding RNA sequencing of three extracellular vesicle subtypes released from the human colon cancer LIM1863 cell line*. Sci Rep, 2016. **6**: p. 38397.
331. Ricklefs, F., et al., *Extracellular Vesicles from High-Grade Glioma Exchange Diverse Pro-oncogenic Signals That Maintain Intratumoral Heterogeneity*. Cancer Res, 2016. **76**(10): p. 2876-81.
332. Godlewski, J., et al., *MicroRNA Signatures and Molecular Subtypes of Glioblastoma: The Role of Extracellular Transfer*. Stem Cell Reports, 2017. **8**(6): p. 1497-1505.
333. Galloway, A., et al., *Upregulation of RNA cap methyltransferase RNMT drives ribosome biogenesis during T cell activation*. Nucleic Acids Res, 2021. **49**(12): p. 6722-6738.
334. Ronchetti, D., et al., *Small nucleolar RNAs as new biomarkers in chronic lymphocytic leukemia*. BMC Med Genomics, 2013. **6**: p. 27.
335. Ma, D., et al., *Changes in the Small Noncoding RNAome During M1 and M2 Macrophage Polarization*. Front Immunol, 2022. **13**: p. 799733.
336. Huber, L.T., et al., *Liquid biopsy: an examination of platelet RNA obtained from head and neck squamous cell carcinoma patients for predictive molecular tumor markers*. Explor Target Antitumor Ther, 2023. **4**(3): p. 422-446.
337. Shang, X., et al., *SNORD63 and SNORD96A as the non-invasive diagnostic biomarkers for clear cell renal cell carcinoma*. Cancer Cell Int, 2021. **21**(1): p. 56.
338. Grutzmann, K., et al., *Identification of novel snoRNA-based biomarkers for clear cell renal cell carcinoma from urine-derived extracellular vesicles*. Biol Direct, 2024. **19**(1): p. 38.
339. Zhao, Y., et al., *Expression signature of six-snoRNA serves as novel non-invasive biomarker for diagnosis and prognosis prediction of renal clear cell carcinoma*. J Cell Mol Med, 2020. **24**(3): p. 2215-2228.
340. Gomez-Matas, J., et al., *SnoRNA profiling in colorectal cancer and assessment of non-invasive biomarker capacity by ddPCR in fecal samples*. iScience, 2024. **27**(3): p. 109283.
341. Savelyeva, A.V., et al., *Variety of RNAs in Peripheral Blood Cells, Plasma, and Plasma Fractions*. Biomed Res Int, 2017. **2017**: p. 7404912.
342. Tan, C., et al., *Noncoding RNAs Serve as Diagnosis and Prognosis Biomarkers for Hepatocellular Carcinoma*. Clin Chem, 2019. **65**(7): p. 905-915.