

Streszczenie w języku polskim

Płaskonabłonkowe nowotwory obszaru głowy i szyi (ang. Head and Neck Squamous Cell Carcinoma, HNSCC) wywodzą się z górnego odcinka przewodu oddechowo-pokarmowego, a głównymi czynnikami ryzyka są: palenie tytoniu, nadmierne spożywanie alkoholu oraz zakażenie wirusem brodawczaka ludzkiego (ang. Human Papillomavirus, HPV). Jak dotąd głównymi sposobami leczenia HNSCC są: chirurgiczna resekcja guza, radioterapia oraz chemioterapia, aczkolwiek nawet w przypadku połączenia tych trzech metod rezultaty leczenia są dalekie od satysfakcjonujących. Również nowo opracowywane terapie i podejścia w leczeniu HNSCC nie są skuteczne, co sprawia, iż tak istotnym jest poszukiwanie nowych możliwości leczenia HNSCC poprzez dopasowanie terapii do molekularnego typu nowotworu. Jednym z takich kierunków jest określenie profilu ekspresji cząsteczek RNA niekodujących białka (ncRNA) i ich znaczenia w biologii nowotworu, odpowiedzi na terapię oraz znaczenia klinicznego i diagnostycznego. Wśród ncRNA można wyróżnić zarówno długie jak i krótkie, niekodujące RNA. Do wspomnianej grupy krótkich, niekodujących RNA należą *YRNA*, wśród których można wyróżnić *YRNA1*, *YRNA3*, *YRNA4* i *YRNA5*. Podstawowymi funkcjami *YRNA* są: inicjacja replikacji DNA tworząc nowe widelki replikacyjne oraz tworzenie białkiem Ro60 rybonukleoproteinowego kompleksu. Kompleks ten często po połączeniu się z antygenami staje się celem w chorobach autoimmunologicznych takich jak toczeń rumieniowaty układowy czy zespół Sjörgena. W chorobach nowotworowych zaobserwowano rozregulowanie ekspresji *YRNA* co wpływa na procesy nowotworowe w takich chorobach jak: rak pęcherza, prostaty, jajnika, jasnokomórkowy rak nerki czy niedrobnokomórkowy rak płuc. Jednakże brakuje badań dotyczących znaczenia biologicznego, klinicznego czy diagnostycznego jakie mogą pełnić *YRNA* w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi.

Głównym celem pracy jest określenie biologicznej roli *YRNA* w płaskonabłonkowych nowotworach obszaru głowy i szyi. Dodatkowymi celami są: określenie poziomu ekspresji *YRNA* w komórkach HNSCC i tkankach pacjentów HNSCC, korelacja *YRNA* z cechami kliniczno-patologicznymi; określenie roli *YRNA* w zakażeniach wirusem HPV, wskazanie procesów i ścieżek molekularnych związanych ze zmianą poziomu *YRNA1* w komórkach nowotworowych oraz określenie znaczenia klinicznego i diagnostycznego *YRNA*.

Realizując powyższe cele przeprowadzono analizy oparte o model *in silico* oraz *in vitro*. Za pomocą ilościowego PCR w czasie rzeczywistym (qRT)-PCR zmierzono ekspresję *YRNA* w liniach komórkowych HNSCC, 20 dopasowanych archiwalnych tkankach nowotworowych i prawidłowych oraz 70 archiwalnych FFPETs pochodzących od pacjentów z HNSCC.

Wykorzystując dane TCGA oraz GEO, przeprowadzono analizę poziomu ekspresji wybranych genów oraz parametrów kliniczno-patologicznych. Profil ekspresji transkryptomu w zależności od poziomu ekspresji *YRNA1* został przeanalizowany przy użyciu metody wzbogacenia zestawu genów (GSEA) w celu określenia różnic w procesach biologicznych między grupami pacjentów z wysoką i niską ekspresją *YRNA1*. Dodatkowo, komórki linii komórkowych (FaDu – model raka gardła dolnego i Detroit562 – model raka gardła) zostały zmodyfikowane za pomocą wektora plazmidowego (pcDNA3.1(+)-hRNY1[NR_004391.1]) w celu sztucznego zwiększenia poziomu ekspresji *YRNA1*. Uzyskane modele komórkowe posłużyły do określenia wpływu zwiększonej ekspresji *YRNA1* na zmiany w transkryptomie dzięki analizie sekwencjonowania następnej generacji (NGS) i porównaniu różnic między linią ze zwiększoną ekspresją analizowanego genu i linią kontrolną (modyfikowaną plazmidem pcDNA3.1(+)) i analizie ścieżek molekularnych i procesów biologicznych przy użyciu narzędzia REACTOME. Dodatkowo przeprowadzono analizę dekonwolucji w celu określenia wpływu *YRNA1* na komórki odpornościowe. Do obliczeń statystycznych wykorzystano program GraphPad Prism 5 i 9 oraz metody obliczeniowe takie jak: test rozkładu normalnego Shapiro-Wilka; test t-Studenta lub U test Manna-Whitney’a; jednokierunkowa analiza wariancji (ANOVA), test Kruskala-Wallisa i post-test: test porównań wielokrotnych Dunna lub test porównań wielokrotnych Tukey’a; test korelacji Spearmana; testy log-rank (Mantel-Cox), Gehan-Breslow-Wilcoxon; współczynnik ryzyka (Mantel-Haenszel; HR); obliczono 95% przedział ufności (CI) współczynnika; zastosowano analizę ROC i obliczono pole pod krzywą (AUC). We wszystkich analizach jako znaczącą istotność statystyczną przyjęto $p < 0,05$ i $FDR < 0,25$.

Stwierdzono, iż ekspresja *YRNA1* i *YRNA5* jest znacząco obniżona w liniach komórkowych HNSCC, a *YRNA1* wykazuje istotnie obniżoną ekspresję również w próbkach nowotworowych pacjentów. Ponadto, *YRNA1*, *YRNA4* i *YRNA5* wykazują znacznie większą ekspresję w próbach pacjentów ze stwierdzonym stadium T4 nowotworu. Wykazano, że poziom ekspresji *YRNA1* umożliwia odróżnienie tkanki zdrowej od nowotworowej z wysoką czułością i specyficznością (AUC = $0,7975 \pm 0,07486$; $p = 0,001295$). Analiza danych TCGA wykazała, że ekspresja *YRNA1* była znacząco zmieniona przy zakażeniu wirusem HPV. Ponadto, pacjenci z wysoką ekspresją *YRNA1* wykazywali lepsze wyniki przeżycia w porównaniu z pacjentami o niskiej ekspresji *YRNA1* (DFS $p = 0,0130$; HR = 2,924; 95% CI: 1,254–6,818; OS $p = 0,0083$; HR = 2,195; 95% CI: 1,225–3,934). Zauważono, że geny skorelowane z *YRNA1* były związane z różnymi procesami zachodzącymi podczas procesu nowotworzenia takimi jak: apoptoza, cykl komórkowy, przerzutowanie

nowotworu, przejście EMT oraz z nowotworowymi komórkami macierzystymi. Analiza GSEA wykazała wysokie wzbogacenie ekspresji genów związanych z: sekrecją białek, wiązaniem receptora naskórkowego czynnika wzrostu, RB (szlak zależny od RB), EIF4E (szlak zależny od EIF4E), ERBB2 (szlak zależny od ERBB2), VEGF (szlak zależny od VEGF), EGFR (szlak zależny od EGFR) i cAMP (szlak zależny od cAMP). Następnie dowiedziono iż, *YRNA* są w większości związane z bardziej zaawansowanymi stadiami raka w grupie HPV pozytywnej, a poziomy ekspresji *YRNA3* i *YRNA1* są skorelowane z bardziej zaawansowanymi stadiami klinicznymi pomimo statusu zakażenia HPV. *YRNA5* był związany z mniej zaawansowanymi stadiami nowotworu w grupie HPV negatywnej. Analizy przeżycia pacjentów w oparciu o dane z bazy GEO wykazały przeciwstawne wyniki pomiędzy grupami HPV. Ekspresja *YRNA*, zwłaszcza *YRNA1*, korelowała z procesami związanymi z infekcjami wirusowymi i odpowiedzią immunologiczną na wirusy. Linie komórkowe HNSCC ze zwiększoną ekspresją *YRNA1* wykorzystano do analizy sekwencjonowania RNA i analizy zmian w ścieżkach molekularnych i procesach biologicznych. Stwierdzono, że komórki ze zwiększonym poziomem *YRNA1* wykazują korelację z procesami związanymi z ekspresją genów wirusowych, latencji wirusa oraz z procesami immunologicznymi i odpowiedzi immunologicznej.

Po raz pierwszy wskazano, że poziomy ekspresji *YRNA* są zmienione w próbach pacjentów i liniach komórkowych HNSCC. Otrzymane wyniki wskazują potencjał *YRNA* jako biomarkerów diagnostycznych i prognostycznych w HNSCC. Ponadto, pierwszy raz został potwierdzony silny związek pomiędzy *YRNA1* oraz zakażeniem wirusem HPV i przebiegiem choroby nowotworowej. Wykazane zmiany w licznych istotnych ścieżkach molekularnych i procesach biologicznych wskazują na potencjalne wykorzystanie *YRNA* jako nowych celów diagnostyki i potencjalnych celów terapii molekularnych.