

## Abstract

High-grade gliomas (HGGs), the most frequent and severe primary brain tumours in adults, invariably recur due to incomplete surgery or therapeutic resistance. The major checkpoint in regulation of gene expression is the initiation of transcription, which is mostly regulated by a class of DNA-binding proteins known as transcription factors (TFs). The expression of essential TFs is required by cancer cells to carry on a variety of biological processes in cancer cells such as cellular transformation, oncogenesis and progression, cell proliferation, metastasis, and chemo-resistance. In HGGs, several interconnected biological components such as somatic mutations, transcriptomic and TF dysregulations, as well as alterations in histone modifications, DNA methylation and chromatin remodelling contribute to the disease aggressiveness. Transcriptomic profiles of HGGs at recurrence have not been thoroughly investigated yet. Moreover, despite significant efforts, the specific regulation of genes overexpressed in HGGs by TFs remains largely unknown. A better understanding of events occurring in open chromatin regions in HGGs is crucial to comprehend routes of brain cancer progression.

We employed targeted DNA- and RNA-sequencing to identify single nucleotide variants, small insertions and deletions, copy number aberrations (CNAs), gene expression alterations and pathway dysregulations in 16 matched pairs of primary and recurrent HGGs. The majority of somatic mutations found in primary HGGs were not found in relapsed tumours, implying a sub-clone substitution during tumour progression. A novel frame-shift insertion in the *ZNF384* gene was discovered, which may play a role in extracellular matrix remodelling. The presence of focal CNAs in the *EGFR* and *PTEN* genes was found to be inversely correlated. *In silico* analysis of the tumour microenvironment demonstrated that tumour supportive (M2) macrophages and immature dendritic cells are enriched in recurrent HGGs indicating a prominent immunosuppressive signature in those tumours. Immunohistochemistry staining of tumour sections confirmed the accumulation of immunosuppressive cells in recurrent HGGs.

We identified glioma grade-specific TFs binding sites in glioblastoma tissues as well as in human LN18 and LN229 glioma cells, using ATAC-seq data and confirmed their roles in controlling gene regulatory networks in HGGs. We explored different datasets that comprise DNA methylation profiles, histone acetylation profiles, GBM cell line RNA-seq and TCGA (the Cancer Genome Atlas) datasets (RNA-seq and Illumina 450K array DNA methylation). The comparative analyses of those profiles in gliomas of different malignancy grades revealed the importance of the c-Jun TF for the disease progression. c-Jun may play a role in the regulation of genes overexpressed in glioblastoma by binding to the gene promoters. Furthermore, we found that in the majority of c-Jun gene targets, DNA methylation plays an important role in the c-Jun dependent regulation. The bioinformatic

predictions have been validated experimentally by testing c-Jun binding to various probes in the electrophoretic mobility shift assay (EMSA).

Chromatin remodelling proteins SMARCA2 and SMARCA4 are frequently mutated in high-grade gliomas. To determine the role of those proteins, we performed knockdown of genes coding them in human LN18 glioma cells and tested the impact of *SMARCA2* and *SMARCA4* deficiencies on chromatin accessibility using the Assay for Transposase Accessible Chromatin with high-throughput sequencing (ATAC-seq). We discovered an increase in chromatin openness in SMARCA2/4 deficient cells, which affected expression of genes critical for signal transduction, including those from the transforming growth factor beta pathway: *SMAD1*, *SMAD3*, *BMPR1A*, and *TGFBR2*, implying the interdependence of chromatin remodellers and specific signalling pathways.

**Keywords:** High-grade gliomas, tumour recurrence, transcriptional deregulation, transcription factors, chromatin accessibility, DNA methylation.

## Streszczenie

Glejaki wysokiego stopnia złośliwości (HGGs), najczęstsze i najcięższe pierwotne guzy mózgu u dorosłych, niezmiennie ulegają wznowom z powodu niekompletnej operacji lub oporności na leczenie. Głównym punktem kontrolnym w regulacji ekspresji genów jest inicjacja transkrypcji, która regulowana jest głównie przez klasę białek wiążących DNA, znanych jako czynniki transkrypcyjne (TF). Ekspresja niezbędnych TF wymagana jest przez komórki rakowe do prowadzenia różnych procesów biologicznych w komórkach rakowych, takich jak transformacja komórkowa, onkogeneza i progresja, proliferacja komórek, przerzuty i chemooporność. W HGGs do agresywności choroby przyczynia się kilka powiązanych ze sobą elementów biologicznych, takich jak mutacje somatyczne, deregulacje ścieżek transkrypcyjnych, a także zmiany w modyfikacjach histonów, metylacja DNA oraz przebudowa chromatyny. Profile transkryptomyczne HGGs w momencie wznowy guza nie zostały jeszcze dokładnie zbadane. Ponadto, pomimo znacznych wysiłków, specyficzna regulacja genów ulegających podwyższonej ekspresji w HGGs przez TF pozostaje w dużej mierze nieznaną. Lepsze zrozumienie zdarzeń zachodzących w otwartych regionach chromatyny w HGGs ma kluczowe znaczenie dla zrozumienia dróg progresji raka mózgu.

Zastosowaliśmy sekwencjonowanie DNA ze wzbogaceniem w sekwencje egzonowe oraz sekwencjonowanie RNA, aby zidentyfikować warianty pojedynczych nukleotydów, małe insercje i delecje, zmiany liczby kopii (CNA), zmiany ekspresji genów i deregulacje szlaków sygnałowych w 16 parach guzów pierwotnych oraz wznów HGGs. Większość mutacji somatycznych wykrytych w pierwotnych HGGs nie została znaleziona we wznowach guzów, co sugeruje substytucję subklonu podczas progresji nowotworu. Odkryto nową insercję przesuwającą ramkę odczytu w genie ZNF384, która może odgrywać rolę w przebudowie macierzy zewnątrzkomórkowej. Stwierdzono, że obecność ogniskowych zmian CNA w genach EGFR i PTEN jest odwrotnie skorelowana. Analiza *in silico* mikrośrodowiska guza wykazała, że makrofagi o fenotypie M2, podtrzymujące rozwój nowotworu oraz niedojrzałe komórki dendrytyczne są wzbogacone w nawracających HGGs, co wskazuje na znaczącą sygnaturę immunosupresyjną w tych guzach. Barwienie immunohistochemiczne skrawków guza potwierdziło akumulację komórek immunosupresyjnych w nawracających HGG.

Zidentyfikowaliśmy miejsca wiążące TF specyficzne dla glejaka w tkankach glejaka, a także w ludzkich komórkach glejaka LN18 i LN229, korzystając z danych ATAC-seq i potwierdziliśmy rolę tych TF w kontrolowaniu sieci regulatorowych genów w HGGs. Zbadaliśmy różne zestawy danych, które obejmują profile metylacji DNA, profile acetylacji histonów, zestawy danych RNA-seq dla linii komórkowych glejaków wielopostaciowych oraz dla danych TCGA (The Cancer Genome Atlas). Analizy porównawcze tych profili w glejakach o różnym stopniu złośliwości ujawniły znaczenie czynnika transkrypcyjnego c-Jun dla progresji choroby. c-Jun może odgrywać rolę w regulacji genów ulegających podwyższonej ekspresji w glejaku przez wiązanie się z promotorami genów. Ponadto

odkryliśmy, że w większości docelowych genów c-Jun metylacja DNA odgrywa ważną rolę w ich regulacji. Predykcje bioinformatyczne zweryfikowane zostały doświadczalnie, testując wiązanie c-Jun z różnymi sondami w teście opóźnienia ruchliwości elektroforetycznej (EMSA).

Białka remodelujące chromatynę SMARCA2 i SMARCA4 są często zmutowane w glejakach o wysokim stopniu złośliwości. Aby określić rolę tych białek, przeprowadziliśmy wyciszenie kodujących je genów w ludzkich komórkach glejaka LN18 i przetestowaliśmy wpływ niedoborów SMARCA2 i SMARCA4 na dostępność chromatyny za pomocą testu dla chromatyny dostępnej dla transpozycji z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem (ATAC-seq). Odkryliśmy wzrost otwartości chromatyny w komórkach z niedoborem SMARCA2/4, co wpłynęło na ekspresję genów krytycznych dla transdukcji sygnału, w tym ze szlaku transformującego czynnika wzrostu beta: SMAD1, SMAD3, BMPR1A i TGFBR2, co sugeruje współzależność remodelerów chromatyny i specyficznych szlaków sygnałowych.

**Słowa kluczowe:** Glejaki wysokiego stopnia złośliwości, nawrót guza, deregulacja transkrypcji, czynniki transkrypcyjne, dostępność chromatyny, metylacja DNA.