

## ABSTRACT

---

Malignant gliomas are primary tumours of the central nervous system. They remain one of the hardest to treat brain tumours due to their invasive phenotype, the immunosuppressive microenvironment and anatomical localisation in vital areas of the brain. The intratumoural heterogeneity and overexpression of enzymes involved in DNA replication and repair, impair the effectiveness of commonly used therapies, leading to an inevitable relapse of the tumour.

The RecQ helicases are considered 'guardians of the genome', as they play the fundamental roles in DNA replication, repair and maintaining genome stability. The RecQ family is composed of several structurally related helicases, including BLM (Bloom Syndrome) helicase. The involvement of RecQ helicases in tumorigenesis and responses to therapies in malignant brain tumours is not fully understood, thus we aimed to elucidate the role of BLM in these processes.

The Cancer Genome Atlas (TCGA) dataset analyses and immunostaining of numerous tumour sections demonstrated that BLM is overexpressed in high grade gliomas (WHO grade 3 and 4). In malignant gliomas BLM localisation was detected in the cytoplasm whereas in benign tumours BLM was present mostly in the nuclear compartment. High BLM levels were detected in several glioma cell lines and primary patient derived cultures. To decipher the role of BLM in gliomas, BLM deficient LN18 and LN229 cells were generated using CRISPR/Cas9 genome editing technology. BLM deficiency (KO) had minor effects on basal cell viability and proliferation. However, the cell responses to chemotherapeutics, in particular to the combination of temozolomide (TMZ, a DNA methylating agent common used in glioblastoma therapy) and olaparib (OLA, a PARP inhibitor) were changed. Unexpectedly, BLM KO cells were more resistant to the combined treatment than wild type (WT) cells that underwent apoptosis. Moreover, this effect was exclusive for TMZ combined with PARP inhibitors. The BLM KO cells were not sensitive to PARP inhibitors, in contrast to expected the synthetic lethality. BLM KO cells displayed the therapy induced cellular senescence (LN229) or polyploidy (LN18). The polyploidy in p53-deficient LN18 cells was reversed by forced p53 expression. Interestingly, RecQL4-depleted LN18 and LN229 cells responded to TMZ+OLA similarly to WT cells which indicates specialised and non-overlapping functions of RecQ family helicases.

To obtain more insights into the functions of distinct RecQ helicases we generated *blm* and *recql4* knock-out in *Xenopus* frogs to evaluate roles of the helicases in the embryonic development. Considerable mortality of tadpoles was noted and helicase-depleted tadpoles displayed morphological and functional developmental abnormalities.

Altogether, the present study demonstrates important and specific functions of BLM and RecQL4 helicases in glioma cell responses to chemotherapy. As BLM expression was highly elevated and inversely correlated with survival of patients with malignant gliomas, we postulate that BLM could be a therapeutic target. The assessment of BLM levels, p53 and MGMT, a DNA repair enzyme, status might be helpful in choosing the proper therapy against malignant gliomas.

## STRESZCZENIE

---

Glejaki złośliwe są pierwotnymi nowotworami ośrodkowego układu nerwowego i pozostają jednymi z najtrudniejszych do leczenia guzów mózgu ze względu na inwazyjny fenotyp, immunosupresyjne mikrośrodowisko i anatomiczną lokalizację w ważnych obszarach mózgu. Heterogenność nowotworu i zwiększona ekspresja enzymów biorących udział w replikacji i naprawie DNA, osłabia skuteczność powszechnie stosowanych terapii, co prowadzi do nieuchronnego nawrotu nowotworu.

Helikazy RecQ są uważane za „strażników genomu” i odgrywają fundamentalną rolę w procesach replikacji DNA, naprawie i utrzymaniu stabilności genomu. Rodzina helikaz RecQ składa się z kilku, strukturalnie podobnych enzymów, do których należy helikaza BLM (Bloom Syndrome). Zaangażowanie helikaz RecQ w powstawanie nowotworów i odpowiedzi na terapie złośliwych guzów mózgu nie jest w pełni poznane, dlatego podjęliśmy badania, aby wyjaśnić rolę BLM w tych procesach.

Analiza danych z repozytorium The Cancer Genome Atlas (TCGA) i barwienie immunohistochemiczne skrawków licznych guzów wykazały, że ekspresja BLM zarówno na poziomie mRNA i białka jest podwyższona w glejakach o wysokim stopniu złośliwości (stopień 3 i 4 wg Światowej Organizacji Zdrowia). W glejakach złośliwych obecność BLM wykryto w cytoplazmie, podczas gdy w guzach łagodnych i tkance prawidłowej BLM był obecny głównie w jądrze komórkowym. Wysoki poziom białka BLM wykryto w kilku liniach komórkowych glejaka i pierwotnych hodowlach pochodzących od pacjentów. Aby wyjaśnić rolę BLM w glejakach, usunięto gen *BLM* w komórkach glejaków linii LN18 i LN229 stosując technikę edycji genomu CRISPR/Cas9. Usunięcie BLM (KO) miało niewielki wpływ na żywotność i proliferację komórek w warunkach podstawowych, jednak zmieniło odpowiedzi komórek na chemioterapeutyki. Było to szczególnie widoczne po zastosowaniu temozolomidu (TMZ, środek metylujący DNA, powszechnie stosowany w terapii glejaka wielopostaciowego) i olaparibu (OLA, inhibitor PARP). Nieoczekiwanie, komórki BLM KO były bardziej odporne na kombinację obu leków niż komórki z funkcjonalną helikazą BLM (WT), które umierały na drodze apoptozy. Co więcej, efekt ten występował tylko w przypadku połączenia TMZ z inhibitorami PARP. Komórki BLM KO nie były wrażliwe na inhibitory PARP, w przeciwieństwie do oczekiwanej syntetycznej śmiertelności. Komórki BLM KO wykazywały indukowane terapią starzenie komórkowe (LN229) lub poliploidię (LN18). Występowanie poliploidii w komórkach LN18 z niedoborem p53 było obniżone po przywróceniu funkcjonalnego białka p53. Co ciekawe, komórki LN18 i LN229 pozbawione helikazy RecQL4 reagowały na TMZ+OLA podobnie jak komórki WT, co wskazuje na wyspecjalizowane i niejednakowe funkcje helikaz z rodziny RecQ.

W celu uzyskania informacji na temat funkcji różnych helikaz RecQ, przeprowadzono usunięcie genów *blm* i *recq4* u zarodków żab *Xenopus*, aby ocenić rolę helikaz w rozwoju embrionalnym. Odnotowano znaczną śmiertelność kijanek, a kijanki pozbawione funkcjonalnych helikaz wykazywały morfologiczne i funkcjonalne nieprawidłowości rozwojowe.

Niniejsze badania pokazują ważne i specyficzne funkcje helikaz BLM i RecQL4 w odpowiedzi komórek glejaka na chemioterapię. Status mutacyjny i poziom ekspresji BLM jest szczególnie ważny przy łączeniu terapii TMZ z inhibitorami PARP. Ze względu na podwyższoną ekspresję BLM, która odwrotnie korelowała z przeżyciem pacjentów z glejakami złośliwymi, postulujemy, że BLM może być celem terapeutycznym. Proponujemy, że ocena poziomu BLM oraz statusu p53 i MGMT, jednego z enzymów naprawczych DNA, może być pomocna w wyborze właściwej terapii przeciw glejakom złośliwym.