

# 1 STRESZCZENIE

Mikrośrodowisko nowotworu poza komórkami nowotworowymi zawiera wiele innych typów komórek, m.in. liczne komórki układu odpornościowego. Często komórki tego samego typu, ale znajdujące się w innym obszarze guza, mogą mieć różny fenotyp i pełnić odmienne funkcje. Rozwój technik transkryptomiki i proteomiki pojedynczych komórek umożliwił badanie złożoności mikrośrodowiska w niedostępnej wcześniej rozdzielczości. Poznanie, jak różne komórki w guzie wspierają nowotwór pozwala lepiej zrozumieć mechanizmy jego progresji i racjonalnie projektować celowane techniki terapii.

Złośliwe glejaki to najczęściej występujące pierwotne nowotwory ośrodkowego układu nerwowego, a najbardziej agresywnym wśród nich jest glejak wielopostaciowy. Mikrośrodowisko glejaków nie było szczegółowo zbadane pod kątem heterogenności rezydentnych i naciekających komórek układu odpornościowego ze względu na brak selektywnych markerów różnicujących te typy komórek. Wcześniejsze badania transkryptomyczne RNA-seq komórek sortowanych za pomocą przeciwciał wykazały, że profile transkryptomyczne jednocześnie wskazywały na fenotyp immunosupresyjny i typowy dla odpowiedzi zapalnej. Identyfikacja i charakterystyka subpopulacji komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku glejaków wymagała zastosowania metody, która pozwoliłaby analizować pojedyncze komórki. Z tego powodu w prowadzonych badaniach wykorzystano metodę transkryptomiki pojedynczych komórek (*ang. single-cell RNA-seq, scRNA-seq*).

Celem niniejszej rozprawy było opracowanie zoptymalizowanej metodyki analizy i wizualizacji profili transkryptomicznych (danych scRNA-seq) z komórek mieloidalnych w mikrośrodowisku doświadczalnych glejaków oraz w próbkach z guzów glejaka wielopostaciowego. Wykorzystując dostępne metody przeprowadzono optymalizację parametrów analizy danych scRNA-seq w glejakach GL261 w 14 dniu po implantacji. Porównano również profile transkryptomiczne komórek mieloidalnych w mózгах myszy naiwnych i po operacji pozorowanej. Ponadto przeanalizowano dane scRNA-seq z komórek mieloidalnych z mikrośrodowiska ludzkich glejaków, a także dokonano oceny wpływu wartości parametrów wykorzystywanych metod na uzyskiwane wyniki analiz i ich wizualizacje.

Wykonano pierwszą opublikowaną analizę, w której połączono i bezpośrednio porównano dane scRNA-seq uzyskane z komórek CD11b+ z mikrośrodowiska mysiego glejaka GL261 (a także z mózgów zwierząt naiwnych) pochodzące od samic i samców. Pozwoliło to wyodrębnić zróżnicowane subpopulacje komórek CD11b+, które wcześniej nie były możliwe od rozróżnienia w związku z brakiem optymalnych strategii sortowania. Wykazano również, że uzasadnione było wykorzystanie zwierząt naiwnych w wykonanym doświadczeniu, gdyż profile w komórkach z mózgów po operacji pozorowanej były podobne do tych zidentyfikowanych w komórkach CD11b+ z mózgu myszy naiwnych. Ponadto wykonano analizę profili transkryptomycznych komórek mikrogleju i makrofagów z mikrośrodowiska glejaka wielopostaciowego, pochodzących z próbek od pięciu pacjentów. Zidentyfikowano geny o statystycznie istotnie podwyższonej ekspresji w poszczególnych podgrupach tych komórek, co pozwoliło na wyróżnienie podtypów funkcjonalnych komórek mieloidalnych. Uzyskane wyniki pozwalają na stworzenie nowych hipotez badawczych weryfikujących funkcje zidentyfikowanych subpopulacji komórek mieloidalnych i ich powiązanie z właściwościami mikrośrodowiska złośliwych glejaków.

## 2 ABSTRACT

The tumor microenvironment (TME) besides malignant cells contains various cell types, i.e. numerous immune cells. Often cells of the same type, but located in different areas of the tumor, can exhibit different phenotypes and perform distinct functions. Development of the single-cell transcriptomics and proteomics has enabled to study the complexity of the microenvironment at a previously inaccessible resolution. Understanding how different cells in the tumor support its development allows for a better grasp of the mechanisms behind tumor progression and the rational design of targeted therapeutic techniques.

Malignant gliomas are the most common, primary tumors of the central nervous system and glioblastoma multiforme is the most aggressive among them. The microenvironment of gliomas has not been thoroughly investigated considering the heterogeneity of resident and infiltrating immune cells (due to the lack of selective markers that differentiate these cell types). Previous RNA-seq transcriptomic studies of antibody-sorted cells indicated that transcriptomic profiles simultaneously exhibited an immunosuppressive phenotype and a one typical for an inflammatory response. Identifying and characterizing subpopulations of myeloid cells in the microenvironment required a method capable of analyzing single cells. For this reason, ongoing research was expanded to utilize single-cell RNA-seq (scRNA-seq).

The aim of the study was to develop an optimized methodology for analyzing and visualizing scRNA-seq data from myeloid cells in the microenvironment of experimental gliomas and from myeloid cells sorted from samples of freshly resected GBM tumors. Using established methods, parameters for scRNA-seq data analysis of the GL261 gliomas were optimized for the data collected 14 days post-implantation. Furthermore, transcriptomic profiles of myeloid cells in the brains of naïve mice and those after sham surgery were compared. Additionally, scRNA-seq data from myeloid cells in the human GBM microenvironment were analyzed, assessing the impact of parameter values used in methods on the obtained results and their visualizations.

This was the first published analysis, combining and directly comparing scRNA-seq data obtained from CD11b<sup>+</sup> cells in the microenvironment of mouse GL261 gliomas (as well as from naïve mouse brains) derived from both female and male mice. This allowed for the identification of multiple CD11b<sup>+</sup> cell subpopulations that had previously been impossible to distinguish due

to a lack of known sorting strategies. It was shown that the use of naïve animals in this experiment was justified, as detected transcriptomic profiles in CD11b+ cells from sham operated mice were similar to those from naïve mice. Additionally, transcriptomic profiles of CD11b+ cells from the microenvironment of GBMs were analyzed using samples collected intraoperatively from five GBM patients. Genes with significantly upregulated expression in specific subgroups of these cells were analyzed, allowing for the characterization of their functional subtypes. The obtained results enable the generation of new research hypotheses verifying the functions of identified myeloid cell subpopulations and their connection to the properties of malignant glioma microenvironments.