

Streszczenie

Hipoksja jest częstą cechą guzów litych, wynikającą z nieprawidłowego unaczynienia, które nie jest w stanie dostarczyć wystarczającej ilości tlenu do szybko proliferujących komórek guza. Ten stres fizjologiczny odgrywa kluczową rolę w progresji nowotworu, przyczyniając się do niestabilności genomowej, zwiększając inwazyjność komórek i potencjał przerzutów, osłabiając odpowiedź przeciwnowotworową układu odpornościowego czy zmniejszając skuteczność głównych metod leczenia. Glejak złośliwy z prawidłowym genem IDH (ang. IDH-wild-type glioblastoma, GBM) jest najbardziej agresywnym i śmiertelnym pierwotnym guzem mózgu. Regiony hipoksji w GBM są bardzo rozległe i stanowią istotny czynnik determinujący złe rokowania pacjentów. Ponadto mikrośrodowisko GBM jest naciekane przez różne typy komórek, spośród których dominującą populację stanowią mikroglej i makrofagi związane z glejakiem (ang. glioma-associated microglia and macrophages, GAMs). Komórki te zamiast inicjować odpowiedź przeciwnowotworową, wykazują fenotyp immunosupresyjny wspierając tym samym wzrost guza. Ponadto GAMs są często rekrutowane do hipoksyjnych nisz guza, co może prowadzić do dalszych zmian fenotypowych sprzyjających rozwojowi nowotworu. Jedną z kluczowych odpowiedzi komórkowych na hipoksję jest przebudowa chromatyny poprzez zmiany modyfikacji histonów czy metylację DNA. Jednak stopień, w jakim zmiany te wpływają na zależne od hipoksji przeprogramowanie transkryptomu GBM nie jest jeszcze w pełni poznany. W niniejszej rozprawie doktorskiej zbadano wpływ stresu hipoksycznego na organizację chromatyny i profile transkryptomiczne w mikrośrodowisku glejaka, w szczególności w komórkach GAMs. W pierwszym etapie oceniono wpływ hipoksji na dostępność chromatyny w komórkach glejaka metodą ATAC-seq (ang. Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing). Dane wykazały globalne zmniejszenie dostępności chromatyny w regionach promotorów wielu genów w warunkach hipoksji (<0.1% O₂). Szczególnie dotyczyło to szlaków związanych z przetwarzaniem i splicingiem mRNA oraz regulacją pętli R (ang. R-loop). W kolejnym etapie wykazano, że niedotlenienie zmienia ekspresję kluczowych genów wykorzystywanych do identyfikacji GAMs. W hodowlach komórek GAMs i glejaka *in vitro* oraz w próbkach pochodzących od pacjentów z GBM hipoksja zwiększyła ekspresję markera makrofagów obwodowych *Lgals3*, jednocześnie obniżając ekspresję homeostatycznych markerów mikrogleju *P2ry12* i *Tmem119*. Ponadto hipoksja wpłynęła na ekspresje wielu markerów funkcjonalnych, w tym genów związanych z metabolizmem lipidów, fagocytozą,

chemotaksją, biogenezą rybosomów oraz odpowiedzią interferonową. Część zmian indukowanych przez hipoksję w GAMs była regulowana poprzez przebudowę chromatyny. Wykazano również, że hipoksja indukuje akumulację kropli lipidowych w komórkach mikrogleju i makrofagów poprzez zwiększoną ekspresję genów związanych z magazynowaniem lipidów. Dodatkowo efekt ten może być odwrócony dzięki celowaniu w mechanizmy epigenetyczne, np. przy użyciu inhibitorów deacetylaz histonowych. Podsumowując, przedstawione badania podkreślają rolę hipoksji jako silnego regulatora zmian epigenomicznych i transkryptomicznych w mikrośrodku glejaka, co może mieć kluczowe znaczenie dla dalszych badań podstawowych, jak i dla zastosowań klinicznych.

Abstract

Hypoxia is a common feature of solid tumours, arising from abnormal vasculature that fails to deliver sufficient oxygen to rapidly proliferating tumour cells. This physiological stress plays a pivotal role in tumour progression by contributing to genomic instability, enhancing cellular invasiveness, metastatic potential, suppressing anti-tumour immunity, and reducing the efficacy of major treatments. In IDH-wild-type glioblastoma (GBM), the most aggressive and deadly primary brain tumour, intratumoral hypoxia is highly extensive and represents a critical determinant of poor patient survival. Moreover, the GBM microenvironment is infiltrated by diverse cell types, with glioma-associated microglia and macrophages (GAMs) constituting the predominant population. These cells can adopt immunosuppressive phenotypes and are recognised as major contributors of glioma progression. Since GAMs are commonly recruited to hypoxic niches, such stress can further enhance their tumour-promoting functions. One of key cellular responses to hypoxia is the remodelling of chromatin properties through histone modifications and DNA methylation. However, the extent to which these changes contribute to the hypoxia-driven reprogramming of the GBM transcriptome is not yet fully understood. In this study, the impact of hypoxic stress on chromatin reprogramming and transcriptomic profiles within the glioma TME was investigated, particularly in GAMs. First, using the Assay for Transposase-Accessible Chromatin using sequencing (ATAC-seq) approach, hypoxia-dependent chromatin alterations were assessed in glioma cells. The data revealed global reduction in chromatin accessibility at promoter regions of numerous genes under hypoxic condition (<0.1% O₂). Notably, specific functional pathways were affected, including those involved in mRNA processing and splicing, as well as regulators of R-loop formation. Second, hypoxia was found to alter the expression of key identity marker genes in GAMs. In glioma-co-cultured GAMs *in vitro* and in glioblastoma patient samples, hypoxia upregulated the expression of monocytic marker *Lgals3* and downregulated the homeostatic microglial markers *P2ry12* and *Tmem119*. In addition, hypoxic stress appeared to interfere with multiple functional markers, including genes related to lipid metabolism, phagocytosis, chemotaxis, ribosomal biogenesis, and the interferon response. Some of these hypoxia-induced changes in GAMs were fine-tuned through the changes in chromatin accessibility. Furthermore, it was found that hypoxia induced lipid droplet accumulation in myeloid cells via increased expression of lipid storage-related genes and this effect could be reversed through targeting epigenetic mechanisms with histone deacetylase inhibitors. Overall, these findings highlight hypoxic

stress as a potent epigenomic and transcriptomic regulator of glioma TME which may hold significance for future basic research and clinical applications.