

Dr Michał Ryszard Gdula

Autoreferat

**Rola struktury jądra komórkowego i trójwymiarowej konformacji
chromatyny w kontroli ekspresji genów**

Wydział Biochemii

Uniwersytet Oksfordzki, Wielka Brytania

Oksford 2019

1. Imię i nazwisko: Michał R. Gdula

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

- 03/2011 **Doktor nauk (PhD), biologia molekularna**
"Formowanie tkankowo-specyficznej organizacji chromatyny podczas rozwoju naskórka", promotor: prof. Vladimir Botchkarev, Bradford University, School of Life Science, Center of Skin Science, Wielka Brytania
- 06/2007 **Magister, biologia molekularna**
"Ekspresja małego i średniego antygeny powierzchniowego HBV w pokoleniu T1 transgenicznej sałaty.", promotor: dr Tomasz Pniewski i prof. dr hab. Bogdan Wolk, Instytut Genetyki roślin, Poznań, Polska, a także z ramienia Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, prof. dr hab. Jan Sadowski
- 06/2005 **Licencjat, biologia molekularna**
"Autosomalna dominująca wielotorbielowatość nerek a autosomalna dominująca wielotorbielowatość wątroby", promotor: prof. dr hab. Halina Augustyniak, Uniwersytet im. Adam Mickiewicza, Poznań
- 03/2005 **Magister, Finanse i Rachunkowość przedsiębiorstw**
"Powody finansowej straty w przedsiębiorstwie z ograniczoną odpowiedzialnością w latach 1998-2002", promotor: prof. dr hab. Danuta Krzemińska, Akademia Ekonomiczna (aktualnie: Uniwersytet Ekonomiczny w Poznaniu), Poznań

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych:

06/2012 – obecnie

Postdoc, Wellcome Trust Centre for Human Genetics oraz Department of Biochemistry, University of Oxford, Oksford, Wielka Brytania

03-05/2012

Wizytujący naukowiec, Max Planck Institute of Immunobiology and Epigenetics, Fryburg, Niemcy

04/2011-02/2012

Postdoc, Boston University, School of Medicine, Department of Biology, Stany Zjednoczone

10/2007-03/2011

Doktorant, Bradford University, School of Life Science, Center of Skin Science, Wielka Brytania

4. Wskazanie osiągnięcia wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. 2017 r. poz. 1789)

a) tytuł osiągnięcia naukowego:

Rola struktury jądra komórkowego i trójwymiarowej konformacji chromatyny w kontroli ekspresji genów

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego:

1. Botchkarev, Vladimir A., **Michał R. Gdula**, Andrei N. Mardaryev, Andrei A. Sharov, and Michael Y. Fessing, "Epigenetic Regulation of Gene Expression in Keratinocytes." 2012, **The Journal of Investigative Dermatology** 132 (11): 2505–21, **Impact factor: 6.64**, praca przeglądowa, <https://doi.org/10.1038/jid.2012.182>

2. **Gdula, Michał R.**, Krzysztof Poterłowicz, Andrei N. Mardaryev, Andrey A. Sharov, Yonghong Peng, Michael Y. Fessing, and Vladimir A. Botchkarev. "Remodeling of Three-Dimensional Organization of the Nucleus during Terminal Keratinocyte Differentiation in the Epidermis." 2013, **The Journal of Investigative Dermatology** 133 (9): 2191–2201, **Impact factor: 6.64**, <https://doi.org/10.1038/jid.2013.66>

3. Mardaryev, Andrei N., **Michał R. Gdula**, Joanne L. Yarker, Vladimir U. Emelianov, Vladimir N. Emelianov, Krzysztof Poterłowicz, Andrey A. Sharov, Tatyana Y. Sharova, Julie A. Scarpa, Pierre Chambon, Vladimir A. Botchkarev and Michael Y. Fessing, "P63 and Brg1 Control Developmentally Regulated Higher-Order Chromatin Remodelling at the Epidermal Differentiation Complex Locus in Epidermal Progenitor Cells", 2014, **Development** 141 (1): 101–11, **Impact factor: 6.22**, <https://doi.org/10.1242/dev.103200>

4. **Michał R. Gdula***, Tatyana B. Nesterova*, Greta Pintacuda, Jonathan Godwin, Ye Zhan, Hakan Ozadam, Michael McClellan, Daniella Moralli, Felix Krueger, Catherine M Green, Wolf Reik, Skirmantas Kriaucionis, Edith Heard, Job Dekker, and Neil Brockdorff, "The non-canonical SMC protein SmcHD1 antagonises TAD formation and compartmentalisation on the inactive X chromosome", 2019, **Nature Communications**, 10(1):30, **Impact factor: 12.35**, <https://doi.org/10.1038/s41467-018-07907-2>

* Joint first author

c) Omówienie celu naukowego ww. prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Wprowadzenie

Długość genomu ludzkiego przekracza średnicę jądra komórkowego około 200 tysięcy razy. Dlatego musi być on bardzo mocno upakowany, ale równocześnie dostępny dla dużych kompleksów białkowych biorących udział w replikacji oraz transkrypcji genomu. Dodatkowo, w trakcie cyklu komórkowego oraz podziału komórkowego organizacja chromatyny ulega znacznym zmianom, co powoduje, że na początku każdej interfazy konformacja chromatynowych włókien musi być niezawodnie odtworzona¹. Ponadto, struktury jądrowe

musza zapewnić ekspresję tkanko-specyficznych genów by zabezpieczyć tożsamość komórkową, a także przebieg programów różnicowania komórkowego, zarówno w trakcie różnicowania się komórek u dojrzałych organizmów, jak i w trakcie rozwoju embrionalnego². Niezbędna jest więc zaawansowana trójwymiarowa organizacja chromatyny umożliwiające dynamiczne zmiany w dostępności i upakowaniu interfazowego jądra.

Już niemal 100 lat temu mikroskopia wskazała różnice strukturalne w poszczególnych rejonach jądra³, około dwadzieścia lat później w 1949 Murray Barr zauważył różnice pomiędzy żeńskimi a męskimi jądrami komórkowymi⁴, a od 1982 dzięki badaniom braci Cremer wiemy, że chromosomy nie mieszają się w objętości całego jądra, lecz zajmują ograniczone przestrzenie – „terytoria chromosomowe”⁵.

Do niedawna struktura chromatyny pomiędzy poziomem nukleosomów a terytoriami chromosomowymi była słabo rozumiana. Ostatnie postępy technologiczne szybko zmieniają tę sytuację umożliwiając studiowanie organizacji genomu z dużo większą dokładnością niż dotychczas. W szczególności grupa technik opartych na *chromatin conformation capture* (3C⁶ oraz pochodne 4C, 5C, capture-C and Hi-C⁷) pozwala na uwidocznienie kontaktów DNA-DNA, odzwierciedlających ukształtowanie się genomu. Te techniki wraz z nowoczesnymi protokołami fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH) oraz trójwymiarowej mikroskopii bezprecedensowo napędzają postępy w rozumieniu biologii genomu.

Cel naukowy prac włączonych w osiągnięcie naukowe

Na moje osiągnięcie naukowe składa się cykl czterech publikacji: trzy artykuły naukowe oraz jedna praca przeglądowa. Nadrzędnym celem naukowym tych prac było **pogłębienie zrozumienia epigenetycznej kontroli ekspresji genów poprzez zmiany w strukturze chromatyny wyższego rzędu, w trakcie różnicowania się komórek**. Cele specyficzne obejmowały:

1. Przygotowanie pierwszego kompleksowego przeglądu badań epigenetycznych związanych z biologią skóry (**artykuł 1**).
2. Charakterystyka zmian w strukturze jąder komórkowych w trakcie różnicowania się mysiego naskórka oraz zbadania, jak wiąże się to ze zmianami ekspresji genów (**artykuł 2**).
3. Opis zmian konformacji locus EDC zawierającego geny specyficzne dla naskórka (**artykuł 3**).
4. Zbadanie jaką rolę w uwarunkowanym rozwojem naskórka zmianami konformacji EDC odgrywa nadrzędny regulator p63 a także modyfikator chromatyny Brg1 (**artykuł 3**).
5. Zbadanie mechanizmu działania SmcHD1 w ustanawianiu inaktywacji chromosomu X w żeńskich komórkach u myszy (**artykuł 4**).
6. Zbadanie jak SmcHD1 wpływa na strukturę wyższego rzędu nieaktywnego żeńskiego chromosomu X (**artykuł 4**).

Omówienie wyników badań włączonych do osiągnięcia naukowego

W **artykule 1** przedstawiłem pierwszy kompleksowy przegląd odkryć w dziedzinie epigenetycznej regulacji ekspresji genów w naskórku. Naskórek to ważny model badawczy z uwagi zarówno na jego znaczenie kliniczne, ale także przydatność dla naukowców. Jest to samo-odnawiająca się tkanka składająca się z warstw zróżnicowanych do różnego stopnia keratynocytów, z dzielącymi się komórkami prekursorowymi w warstwie bazalnej^{8,9}. Naskórek ma prostą morfologię, jest łatwo dostępny i może być stosunkowo prosto poddawany różnym manipulacjom. W trakcie terminalnego różnicowania się keratynocytów, jądro komórkowe przechodzi przez zaprogramowaną transformację od stanu aktywnego,

związanego z wykonywaniem programów genetycznych potrzebnych do różnicowania się oraz utworzenia bariery naskórka, do stanu w pełni nieaktywnego w część wierzchniej skeratynizowanej warstwy naskórka. W tej pracy przeglądowej zaprezentowałem obraz skomplikowanej epigenetycznej regulacji proliferacji oraz różnicowania się keratynocytów. Zmiany zarówno w lokalnej chromatynie jak i organizacji wyższego rzędu wpływają na:

- regulację genów związanych z cyklem komórkowym;
- kontrolę ekspresji genów związanych z terminalnym różnicowaniem się keratynocytów;
- programy ekspresji genów zależne od poszczególnych czynników transkrypcyjnych, takich jak p63 NF-κB lub cMyc.

Proliferacja komórek progenitorowych keratynocytów może być stymulowana przez grupę czynników, które działają głównie jako represywne regulatory chromatyny (HDACs HDAC1/2, komponenty systemu polycomb Cbx4, Bmi1, Ezh1/2, a także DNMT1) poprzez negatywną regulację ekspresji inhibitorów cyklu komórkowego jak np. p16INK4A, p15INK4B, p19ARF, oraz p21. Ponadto niektóre z tych czynników (Ezh1/2, Jarid2, DNMT1) powstrzymują również przedwczesną aktywację genów związanych z terminalnym różnicowaniem, dodatkowo pomagając w utrzymaniu populacji nie zróżnicowanych keratynocytów. Tymczasem terminalne różnicowanie się keratynocytów może być wspomagane przez niektóre modyfikatory chromatyny, które zwykle wspierają aktywną transkrypcję, takie jak ATP-zależny modyfikator chromatyny Brg1, demetylaza histonowa Jmjd3 lub organizator genomu Satb1. Pomimo rosnącej liczby odkryć, wiele obserwacji w dalszym ciągu nie jest w pełni zrozumiana. W szczególności nieznane są mechanizmy kontrolujące specyficzność różnych typów epigenetycznych czynników w regulowaniu poszczególnych genów/loci w keratynocytach. Niezbędnym krokiem do tego celu jest lepsze zrozumienie topologicznej organizacji genomu, a także związków pomiędzy lokalną organizacją chromatyny a organizacją wyższego rzędu oraz roli jądrowych sub-organelli w różnicowaniu się keratynocytów.

To ostatnie zagadnienie rozwinąłem w **artykule 2**. Poprzednio opublikowana praca (**Fessing M, Madaryev A, Gdula M et al. 2011**; omówiona w punkcie 5.) pokazała, że trójwymiarowa organizacja genomu keratynocytów jest ściśle związana z regulacją ekspresji genów. Moje analizy wykazały, że modyfikator chromatyny Satb1, regulowany bezpośrednio przez czynnik transkrypcyjny p63, kontroluje konformację locus EDC oraz ekspresję genów podczas różnicowania się keratynocytów *in vivo*. Ponadto, przestrzenna organizacja EDC zmienia się również w trakcie różnicowania się keratynocytów *in vitro*^{10,11}. Pomimo rosnącej ilości informacji na temat epigenetycznych mechanizmów kontrolujących terminalne różnicowanie keratynocytów (omówione w artykule 1), brakowało kompleksowej analizy zmian trójwymiarowej architektury jądra w trakcie tego procesu *in situ*. Podobnie, niejasne było do jakiego stopnia organizacja jądra przyjmuje preferencyjne zmiany w poszczególnych stadiach różnicowania się keratynocytów.

Z pomocą 3D-immunoFiSH, wielokolorowej mikroskopii konfokalnej, trójwymiarowej analizy obrazu oraz modelowania matematycznego jądra opisałem zmiany w jądrowej architekturze trzech głównych warstw naskórka: 1. bazalnej, zawierającej prekursorów keratynocytów; 2. spinalnej, zawierającej nie dzielące się zróżnicowane keratynocyty; oraz 3. granularnej, z terminalnie zróżnicowanymi komórkami. Moja analiza pokazała istotne różnice w szeregu parametrów topologicznych w trakcie przejścia z warstwy bazalnej do spinalnej oraz granularnej. W szczególności, moja analiza pokazała, że terminalne różnicowanie się keratynocytów w naskórku i przejście jądra z metabolicznie aktywnego do nieaktywnego stanu związane jest z:

- zmniejszeniem objętości jądra;

- internalizacją oraz zmniejszeniem ilości jąderek;
- ekspansją (przemieszczeniem się bliżej powierzchni jądra) oraz zwiększeniem ilości perycentrometrycznych klastrów heterochromatyny;
- znacznym zwiększeniem się częstości kontaktów między chromosomem 3, zawierającym EDC, a jąderkami;
- podwojeniem się częstości peryferyjnej lokalizacji perycentromerycznych rejonów chromosomów 3.

Zmiana liczby oraz lokalizacji jąderek oraz klastrów perycentrometrycznych ma prawdopodobnie duży wpływ na ekspresję genów. Zarówno klastry perycentrometryczne jak i jąderka, które powstają wokół loci NOR zlokalizowanych na kilku chromosomach, są strukturalnie związane z chromosomami. Dlatego mogą je przemieszczać w kierunku do (albo od) represyjnej części chromatynowego środowiska. Zaproponowałem model, w którym zmiany w topologicznej organizacji genomu umożliwiają uruchomienie i wyłączanie programów ekspresji genów związanych z różnicowaniem epidermalnych keratynocytów *in vivo*.

Artykuł 2 wniósł istotny wkład zarówno w lepsze zrozumienie biologii keratynocytów jak i epigenetyki rozwojowej. Biologiczne znaczenie zaobserwowanych zmian wymaga dalszej pracy badawczej, lecz dane Quinodoz et al.¹² pokazują, że znaczna część genomu wykazuje preferencyjną lokalizację w odniesieniu do jąderek i sugerują, że zmiana lokalizacji poszczególnych loci może wpływać na ich aktywność transkrypcyjną. To samo jest prawdopodobnie prawdziwe w odniesieniu do klastrów perycentrometrycznych, które nie były analizowane w tej pracy.

W **artykule 3** wykonałem badania pokazujące jak trójwymiarowa konformacja chromatyny EDC, locus zawierający geny niezbędne do różnicowania się keratynocytów, zmienia się w trakcie powstawania dojrzałego naskórka w rozwoju embrionalnym myszy, a także demonstrujące biologiczne znaczenie obserwowanych zmian. EDC (ang. Epidermal Differentiation Complex) to unikalne *locus* zawierające 61 funkcjonalnie związanych genów rozmieszczonych u myszy na przestrzeni 3.1 Mb. Centralna część tego *locus* mieści geny biorące udział w różnicowaniu keratynocytów oraz formowaniu bariery epidermalnej. Rejony przylegające do brzegów EDC zawierają geny należące do rodziny S100, ważne poza różnicowaniem naskórka także dla funkcjonowania innych tkanek^{13,14}. Mysie embriony przed E9 (tj. 9 dniem życia embrionalnego) są otoczone powierzchnią ektodermą – pojedynczą warstwą mało zróżnicowanych komórek. Około E9.5, powierzchniowa ektoderma zaczyna różnicować się w kierunku naskórka, co jest związane z ekspresją p63 – nadrzędnego regulatora programu różnicowania się naskórka. Zapoczątkowuje to tworzenie wielowarstwowego naskórka (E14.5) oraz ostatecznie w pełni wykształconego naskórka około E18.5¹⁵.

W celu zbadania dynamiki ekspresji genów w ramach EDC, wykonaliśmy genomową analizę ekspresji za pomocą mikromacierzy na keratynocytach warstwy bazalnej wyizolowanych za pomocą laserowego pozyskiwania mikroskrawków (ang. laser capture micro-dissection). W keratynocytach z E11.5 (przed stratyfikacją) ekspresja genów keratynocyto-specyficznych z centrum EDC, takich jak Loricrine oraz geny z rodziny Lce, była niska. Pomiędzy E14.5 i E16.5 transkrypcja tych genów stopniowo zwiększała się, osiągając maksymalne wartości w naskórku dojrzałych myszy. Geny rodziny S100 zlokalizowane na obrzeżach EDC wykazały jedynie niewielkie zmiany w transkrypcji pomiędzy E11.5, E16.5 oraz naskórkiem dorosłych myszy. Kontrolne eksperymenty wykonane w skórnym fibroblastach pokazały, że nie występują u nich zmiany ekspresji obserwowane u keratynocytów – EDC wykazywało niski

poziom ekspresji genów we wszystkich badanych etapach rozwojowych. Williams et al. zauważyli w ludzkich keratynocytach *in vitro*, że EDC jest zlokalizowane na obrzeżach chromosomu pierwszego¹¹ (który zawiera EDC w ludzkim genomie), dlatego postanowiłem sprawdzić czy podobna lokalizacja występuje również w mysich komórkach. W tym celu wykonałem serie eksperymentów 3D-FISH połączonych z mikroskopią konfokalną. Analiza trójwymiarowych danych mikroskopowych pokazała, że w naskórku z E11.5 EDC ulokowane jest na obrzeżach jądra, podczas gdy u embrionów E16.5 EDC zlokalizowane jest wyraźnie w jego wnętrzu. Wykazałem również, że EDC w E16.5 znajduje się preferencyjnie blisko plamek jądrowych (ang. nuclear speckles) – ciałek jądrowych wzbogaconych w czynniki biorące udział w splicingu i umożliwiające wydajną transkrypcję. Moje poprzednie badania (**Fessing M, Mardaryev A, Gdula MR et al. 2011**) pokazały, że p63 reguluje bezpośrednio Satb1, które z kolei odpowiada za odpowiednie upakowanie centralnej domeny EDC. Z kolei analiza 3D FISH lokalizacji EDC wykonana w trakcie prac nad artykułem 3 w komórkach naskórka E16.5 pozbawionych p63 (p63 KO) pokazała, że podobnie do E11.5 jest on jednowarstwowy i w przeciwieństwie do komórek E16.5 typu dzikiego, EDC występuje na obrzeżach jądra. Jednocześnie, ekspresja genów z centralnej części EDC jest mocno obniżona. Dodatkowo, u keratynocytów z E16.5 p63 KO szereg białek modyfikujących chromatynę ma obniżony poziom ekspresji. Jednym z najbardziej dotkniętych białek było Brg1. Analiza 3D FISH wykazała, że w naskórku ze znacznie obniżonym poziomem Brg1, podobnie jak w przypadku p63 KO, locus EDC znajdował się na obrzeżach jądra. Dodatkowo, keratynocyty pozbawione Brg1 wykazywały obniżony poziom ekspresji genów z centralnej domeny EDC.

Podsumowując, w **artykule 3** opisałem zmiany w lokalizacji jądrowej naskóro-specyficznego locus EDC zależne od etapu rozwoju embrionalnego, pokazując, że są one niezbędne dla poprawnej ekspresji genów ważnych w formowaniu się naskórka. Ponadto, zaprezentowałem mechanistyczne wyjaśnienie wskazujące, że obserwowane zmiany w lokalizacji są zależne od Brg1, który z kolei jest bezpośrednio regulowany przez p63. Zasugerowałem również, że internalizacja EDC jest potrzebna by przemieścić locus z transkrypcyjnie represyjnego mikro-środowiska peryferii jądrowych do otoczenia sprzyjającego wydajnej transkrypcji - wnętrza jądra w okolicy plamek jądrowych. Badania prezentowane w artykule 3 dają solidne podstawy do dalszych badań nad epigenetyczną regulacją morfogenezy naskórka. Stanowią także dobry przykład, jak geny mogą być regulowane przez zmiany w strukturze chromatyny wyższego rzędu. Pomimo dalszych badań^{16,17} cały czas nie jest w pełni wyjaśnione jak regulowane są poszczególne geny EDC i dlaczego obrzeża EDC z genami S100 zachowują się odmiennie.

Po badaniach nad wpływem struktury wyższego rzędu na ekspresję genów w naskórku w rozwojowo zaawansowanych embrionach, zdecydowałem się na zmianę systemu eksperymentalnego i dalsze badanie organizacji jądrowej na wcześniejszych etapach rozwoju zarodkowego. Biologicznie istotne interakcje chromatynowe kształtują się stopniowo w trakcie rozwoju organizmu i procesów różnicowania, a ich efekt na ekspresję genów często ujawnia się dopiero kilka etapów rozwojowych później¹⁸. **Artykuł 4** przedstawia moje ostatnio opublikowane badania nad rolą interakcji i topologii chromatyny w ustanawianiu *de novo* inaktywacji żeńskiego chromosomu X. Inaktywacja chromosomu X w mysich komórkach embrionalnych jest unikalnym systemem, umożliwiającym śledzenie, jak na jednym z dwóch identycznych genetycznie, aktywnych chromosomów zmienia się zupełnie epigenetyka oraz prawie wszystkie geny zostają wyciszone. Na każdym etapie możliwe jest porównanie z homologicznym, aktywnym chromosomem X.

Chromatyna nieaktywnego chromosomu X w żeńskich komórkach ssaczych jest zorganizowana w nietypowy sposób: prawie zupełnie brakuje tam topologicznie

powiązanych domen (Topologically Associated Domains - TADs¹⁹), zamiast tego cały chromosom jest strukturalnie podzielony na dwie mega-domeny²⁰. W **artykule 4** pokazuję, że SmcHD1, niekanoniczny członek rodziny białek Smc, odgrywający ważne role w wielu zmianach epigenetycznych oraz wyciszeniu genów na nieaktywnym chromosomie X²¹ (Xi), jest także odpowiedzialny za tę nietypową architekturę chromosomu.

Aby wyjaśnić rolę SmcHD1 w X inaktywacji przeprowadziłem analizę transkrypcji i epigenomu włączając w to analizę interakcji chromatynowych (Hi-C). Żeby zapewnić dane dobrej jakości oraz rozdzielczości wygenerowaliśmy żeńską linię klonalnych mysich fibroblastów (MEF). MEFy pochodziły od myszy o mieszanym podłożu genetycznym – ich rodzice pochodzili z dwóch różnych szczepów: *Mus musculus domesticus* (domesticus) x *Mus musculus castaneus* (castaneus). Stworzyliśmy dwie linie komórkowe: MEFy typu dzikiego oraz z germinalnym SmcHD1 KO. Dzięki licznym jedno nukleotydowym polimorfizmom (SNP; 1 na 250 zasad na chromosomie X) możliwe było zmapowanie ~30% odczytów (ang. reads) do genomów rodzicielskich. Allelo-specyficzna analiza transkrypcji i epigenomu w komórkach SmcHD1 KO wykazała pojawienie się domen mierzących poniżej 1 Mb, charakteryzujących się re-aktywacją genów, hypermetylacją DNA oraz obniżeniem poziomu H3K27me3. Te domeny korelują z wzbogaceniem SmcHD1 na Xi w komórkach typu dzikiego, ponadto przyjmują konformację podobną do aktywnego chromosomu X, włączając w to częściowe odtworzenie TAD'ów. Obserwowane zmiany mogłyby potencjalnie być spowodowane w dużej mierze de-represją genów. Żeby przetestować tę hipotezę wykonałem nową serię eksperymentów Hi-C we współpracy z laboratorium Prof. Joba Dekkera. Nowe eksperymenty zostały wykonane na somatycznym SmcHD1 KO (somKO) – komórkach, w których SmcHD1 zostało inaktywowane po wyizolowaniu z embrionów tzn. po ustanowieniu X inaktywacji (w przeciwieństwie do KO germinalnego). W pełni uformowana X inaktywacja polega na szeregu zsynchronizowanych, choć w dużej mierze redundantnych procesów wyciszających geny. W wielu wypadkach, gdy jeden z tych procesów jest zakłócony - szczególnie, gdy stanie się to po zakończeniu inaktywacji - nie wpływa to na wyciszenie genów. RNA-seq w SmcHD1 somKO potwierdził, że nie ma istotnych zmian w poziomie ekspresji genów na chromosomie X. Natomiast analiza danych Hi-C z komórek SmcHD1 somKO ukazała zmiany w strukturze chromatyny wyższego rzędu podobne do tych z KO germinalnego, u którego większość genów jest aktywna. To wskazuje, że zmiany w konformacji Xi wywołane brakiem SmcHD1 są niezależne lub w małym stopniu zależne od transkrypcji. Dodatkowo sugeruje to również, że ważne może być ustanowienie specyficznej struktury Xi, widocznej u komórek typu dzikiego, w odpowiednim etapie rozwoju embrionalnego. Jest prawdopodobne, że SmcHD1 może wpływać zarówno na wyciszenie genów, jak i zmiany epigenetyczne poprzez ustanowienie odpowiedniej konformacji Xi w określonym „oknie” rozwoju embrionalnego. Jeśli ta konformacja jest obecna w tym krytycznym czasie, to wyciszenie będzie utrzymane nawet jeśli później zostanie ona poważnie zaburzona. ChIP-seq CTCF pokazał, że SmcHD1 wpływa na strukturę Xi najprawdopodobniej poprzez antagonizowanie wiązania CTCF, które ma podstawowe znaczenie w formowaniu większości kontaktów chromatynowych²². Zarówno u germinalnego jak i somatycznego SmcHD1 KO zaobserwowałem zwiększone wiązanie CTCF na nieaktywnym chromosomie X. Projekt został opublikowany najpierw jako preprint w biorXiv²³ a potem w Nature Communications (**artykuł 4**). Pod koniec projektu okazało się, że nad bardzo podobną tematyką pracują dwie inne grupy badawcze^{24–26}. Ich prace w dużym stopniu potwierdziły moje wyniki.

Podsumowanie i najważniejsze wyniki osiągnięcia naukowego:

- scharakteryzowanie dynamiki zmian w architekturze jądra komórkowego w trakcie różnicowania się keratynocytów *in situ* i pokazanie powiązania tych różnic ze zmianami globalnej transkrypcji;
- pokazanie internalizacji locus EDC związanej z postępem w morfogenezie naskórka;
- udowodnienie, że ta internalizacja zależy od nadrzędnego regulatora różnicowania naskórka, czynnika p63, który bezpośrednio kontroluje modyfikatora chromatyny Brg1;
- opisanie transkrypcji oraz krajobrazu epigenetycznego na nieaktywnym chromosomie X w żeńskich MEFach typu dzikiego oraz somatycznym i germinalnym SmcHD1 KO;
- pokazanie, że brak SmcHD1 u germinalnego KO powoduje duże zmiany w konformacji Xi poprzez antagonizowanie wiązania CTCF oraz, że te zmiany korelują z domenami o zmienionej epigenetyce oraz aktywności transkrypcyjnej;
- wykazanie, że zmiany strukturze chromatyny wyższego rzędu są w dużym stopniu niezależne od transkrypcji oraz, że odpowiednia struktura Xi jest ważna głównie w ciągu pewnego „okna” rozwoju embrionalnego.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Na moje pozostałe prace, nie wchodzące w skład osiągnięcia naukowego, składają się:

- 2 artykuły badawcze w tematyce terminacji transkrypcji, wykonane we współpracy z laboratorium Nicka Proudfoota (jeden z nich jako współ-pierwszy autor);
- 3 artykuły badawcze poruszające tematykę aktywności kompleksów polycomb w trakcie X inaktywacji, wykonane w laboratorium Neila Brockdorffa;
- 2 artykuły badawcze w tematyce różnicowania się naskórka wykonane w laboratorium Vladimira Botchkareva (związane tematycznie z osiągnięciem naukowym, ale jeden artykuł zawiera pracę z okresu doktoratu a w drugim nie jestem autorem wiodącym);
- 2 artykuły badawcze publikujące moje wyniki osiągnięte w trakcie pracy magisterskiej na temat dziedziczenia transgenu HBV w śalacie;
- 1 artykuł badawczy oraz 1 rozdział książki w tematyce uszkodzeń DNA, wykonane w czasie doktoratu we współpracę z laboratorium Prof. Diany Anderson, do których przyczyniłem się mikroskopią i analizą obrazu.

Współpraca z grupą Nicka Proudfoota powstała dzięki mojemu szerokiemu zainteresowaniu regulacją transkrypcji, a także zapotrzebowaniem tej grupy na moje umiejętności bioinformatyczne. Oba projekty dotyczyły roli kluczowego czynnika transkrypcyjnego PCF11, który łączy obróbkę RNA z terminacją transkrypcji, i w obu projektach wykonałem całą analizę bioinformatyczną danych NGS. Pierwszy projekt, prowadzony w systemie drożdżowym (**Grzechnik P, Gdula MR et al., 2015**) był w dużej mierze eksperymentalny i moja rola nie była wiodąca. Drugi projekt, o roli PCF11 w terminacji transkrypcji u ludzi i danio pręgowanego (ang. zebrafish, **Kamieniarz-Gdula K*, Gdula MR*, 2019**), opierał się w dużej mierze na analizie eksperymentów cało-genomowych, dlatego jestem jego współ-pierwszym autorem. W tym ostatnim projekcie pokazałem, że zarówno u człowieka jak i u danio rola PCF11 wychodzi poza umożliwianie terminacji transkrypcji. Okazało się, że PCF11 kontroluje ekspresję tysięcy genów na dwa sposoby: 1) zwiększa ekspresję genów umieszczonych blisko siebie poprzez zapobieganie interferencji RNA za pomocą wydajnej terminacji transkrypcji oraz 2) obniża ekspresję podzbioru genów, wzbogaconych w regulatory ekspresji genów, poprzez wywoływanie przedwczesnej terminacji.

W trakcie stażu podoktoranckiego w grupie Prof. Neila Brockdorffa uczestniczyłem w szeregu projektów, z których dotychczas 4 zostały opublikowane (łącznie z artykułem 4

wchodzącym w skład osiągnięcia naukowego). W pracy **Cerase et al. 2014** przeanalizowałem z kolegami rekrutację PRC2 zależną od Xist. Inaktywacja żeńskiego chromosomu X w komórkach ssaczy zostaje ustanowiona poprzez rekrutację czynników modyfikujących chromatynę przez Xist RNA, które pokrywa in cis cały X. Wcześniej wykazano, że kompleks PRC2, który jest jednym z tych czynników, wiąże się bezpośrednio z rejonem Xist, zawierającym powtórki A poprzez interakcję z Ezh2 i Suz12²⁷. W tej pracy pokazujemy, że w 24 godziny po zsynchronizowanej indukcji ekspresji Xist, nowo powstałe wzbogacenia PRC2 występują głównie w rejonach bogatych w geny. Niespodziewanie, nowe miejsca depozycji PRC2 słabo korelują z wyciszeniem genów indukowanym przez Xist. Moja analiza danych z mikroskopii super-rozdzielczej pokazała istotną separację oraz brak ko-lokalizacji pomiędzy transkryptami Xist a elementami PRC2. Te obserwacje nie zgadzają się z poglądem o bezpośrednich oddziaływaniach pomiędzy Xist a białkami kompleksu PRC2 i sugerują, że aktualny model wyjaśniający rekrutację PRC2 w trakcie inaktywacji X powinien zostać zrewidowany. Artykuł **Grijzenhout et al. 2016** demonstrowa, że myszy pozbawione AEBP2, jednego z białek PRC2, wykazują defekty rozwojowe podobne do fenotypu Trithorax. W **Almeida et al. 2017** wraz z kolegami pokazujemy, że paradygmat, mówiący, że kompleks PRC1 jest rekrutowany przez PRC2, przynajmniej w przypadku żeńskiego Xi, jest nieprawdziwy. Na Xi PRC1 pojawia się przed PRC2, a bez niego nie ma rekrutacji PRC2. Moje analizy RNA-seq pokazały, że w mysiej komórce embrionalnej pozbawionej niekanonicznych kompleksów PRC1 zawierających PCGF3 oraz PCGF5 mają znacząco ograniczone wyciszenie genów.

W trakcie mojej pracy w grupie Prof. Vladimira Botchkareva, w **Fessing MY, Mardaryev AN, Gdula MR et al. 2011** pokazaliśmy wraz z kolegami, że p63 realizuje część swoich funkcji poprzez bezpośrednią regulację ekspresji *Satb1* w prekursorach keratynocytów. P63 wiąże się do regulatorowego miejsca *Satb1*, a jego usunięcie powoduje znaczne obniżenie się ilości *Satb1* w naskórku. Myszy *Satb1* KO mają zaburzoną strukturę naskórka. Dodatkowo, moje analizy wykazały, że u keratynocytów pozbawionych *Satb1*, konformacja centralnej części EDC, która u komórek typu dzikiego jest wzbogacona w *Satb1*, jest istotnie zmieniona. Co ciekawe, radialna pozycja wewnątrz jądra się nie zmienia, tak jak ma to miejsce w przypadku opisanego *Brg1* KO (artykuł 3). Te obserwacje pokazały nieznanego mechanizmu, ważnego dla morfogenezy naskórka, w którym *Satb1* jest bezpośrednio regulowany przez *Satb1* ustanawia konformację EDC specyficzną dla keratynocytów, niezbędną dla poprawnej ekspresji genów. W laboratorium Prof. Botchkareva wdrożyłem też protokół 5C w celu dokładnego scharakteryzowania konformacji EDC. Ostatecznie, rozpoczęty przeze mnie projekt został opublikowany po wielu latach w **Poterłowicz K. et al. 2017**. Analiza interakcji chromatynowych w pierwotnych keratynocytach, jak i kontrolnie w tymocytach, gdzie EDC jest nieaktywne, ujawniła interakcje pomiędzy promotorami a enhancerami specyficzne dla keratynocytów. W EDC zaobserwowano kilka TAD'ów oraz intensywne interakcje w ich ramach, a także pomiędzy różnymi TAD'ami bogatymi w geny. Te interakcje, jak pokazały nasze wcześniejsze badania tworzą funkcjonalną sieć niezbędną dla prawidłowej ekspresji genów w EDC w keratynocytach. Szczegółowe wyjaśnienie działania tej sieci wymaga dalszych badań.

W trakcie moich studiów doktoranckich pomogłem grupie Prof. Diany Anderson w mikroskopii, analizie danych, a także opracowaniu metod kwantyfikacji uszkodzeń genomu. Projekty, do których się przyczyniłem zostały opublikowane w **Laubenthal et al. 2012** oraz jako rozdział książki **Laubenthal et al. 2013**.

Moja praca projektu magisterskiego na temat dziedziczenia transgenu HBV w sałacie, wykonywanego pod nadzorem dr Tomasza Pniewskiego została opublikowana w **Pniewski et al. 2011** oraz **Pniewski et al. 2012**.

Jeśli chodzi o wskaźniki bibliograficzne, mój raport cytowani z bazy Web of Science wykazuje h-index = 11, łącznie 435 cytowań, oraz sumaryczny impact factor z bazy Journal Citation Reports równy 137.49 (w tym 31.38 dla osiągnięcia naukowego, oraz 106.11 dla pozostałego dorobku).

Uwagi końcowe i przyszłe plany badawcze

Biologiczne implikacje wynikające z konformacji chromatyny, trójwymiarowej architektury jądra oraz ogólnie biologii genomu są aktualnie intensywnie badane. Spadające ceny sekwencjonowania nowej generacji (NGS), udoskonalone, bardziej dostępne oraz niezawodne protokoły metod opartych na 3C, a także postępy w mikroskopii napędzają bezprecedensowy postęp w zrozumieniu biologii jądra komórkowego. Równocześnie znaczna większość tych badań jest robiona na komórkach hodowanych w kulturach tkankowych, co ma wiele zalet, ale przy badaniu zjawisk w kontekście biologii rozwoju lub różnicowania się komórek jest często suboptymalne albo po prostu błędne.

Czuję się uprzywilejowany, że w trakcie moich badań podoktoranckich miałem szansę pracować w wiodących naukowo ośrodkach z światowej klasy ekspertami. Pozwoliło mi to zyskać wgląd w ich organizację, a także zdobyć duże doświadczenie w technikach chromatynowych, mikroskopii, analizie trójwymiarowych obrazów oraz analizie bioinformatycznej danych NGS.

Przez ostatnie 8 lat, po uzyskaniu dyplomu doktora, brałem udział w wielu projektach badających wpływ architektury jądra oraz interakcji chromatynowych na ekspresję genów, w kilku z nich jako wiodący naukowiec. Miałem okazję prezentować swoje wyniki na wielu międzynarodowych konferencjach naukowych. Organizowałem również seminaria i warsztaty edukacyjne, a także zdobyłem istotne doświadczenie w kierowaniu pracą studentów i doktorantów. W przyszłości będę kontynuować badania nad konformacją chromatyny i kontrolą ekspresji genów. Pod koniec roku planuję założyć grupę badawczą w ramach Zakładu Ekspresji Genów, Instytutu Biologii Molekularnej i Biotechnologii na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza. Aktualnie jestem w trakcie aplikowania o finansowanie: czekam na rozstrzygnięcie mojego wniosku w konkursie OPUS 16, napisałem też wniosek o program NAWA Polskie Powroty, będę też wnioskował o dalsze granty. Jeśli chodzi o tematykę, chciałbym kontynuować badania nad zmianami epigenetycznymi w trakcie rozwoju embrionalnego myszy, robiąc to w bardziej kompleksowy sposób i uwzględniając również etapy rozwojowe nieobjęte w dotychczasowych badaniach. Chciałbym także zastosować capture-C i w dużej mierze zastąpić nim Hi-C, co powinno pozwolić mi na uzyskanie danych o jeszcze lepszej rozdzielczości oraz obniżyć koszty sekwencjonowania. Uważam, że może to mieć również pozytywny wpływ na polską naukę, ponieważ pomimo wagi badań nad konformacją chromatyny, tematyką tą zajmuje się w Polsce mało naukowców.

Bibliography

1. Gibcus, J. H. et al. A pathway for mitotic chromosome formation. *Science* 359, eaao6135 (2018).
2. Dixon, J. R. et al. Chromatin architecture reorganization during stem cell differentiation. *Nature* 518, 331–336 (2015).
3. Heitz, E. Das Heterochromatin der Moose. (Bornträger, 1928).

4. Barr, M. L. & Bertram, E. G. A Morphological Distinction between Neurones of the Male and Female, and the Behaviour of the Nucleolar Satellite during Accelerated Nucleoprotein Synthesis. *Nature* 163, 676–677 (1949).
5. Cremer, T. et al. Rabl's model of the interphase chromosome arrangement tested in Chinese hamster cells by premature chromosome condensation and laser-UV-microbeam experiments. *Human Genetics* 60, 46–56 (1982).
6. Dekker, J. Capturing Chromosome Conformation. *Science* 295, 1306–1311 (2002).
7. the 4D Nucleome Network et al. The 4D nucleome project. *Nature* 549, 219–226 (2017).
8. Gonzales, K. A. U. & Fuchs, E. Skin and Its Regenerative Powers: An Alliance between Stem Cells and Their Niche. *Developmental Cell* 43, 387–401 (2017).
9. Koster, M. I. & Roop, D. R. Mechanisms Regulating Epithelial Stratification. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* 23, 93–113 (2007).
10. Marella, N. V., Seifert, B., Nagarajan, P., Sinha, S. & Berezney, R. Chromosomal rearrangements during human epidermal keratinocyte differentiation. *Journal of Cellular Physiology* 221, 139–146 (2009).
11. Williams, R. R. E., Broad, S., Sheer, D. & Ragoussis, J. Subchromosomal Positioning of the Epidermal Differentiation Complex (EDC) in Keratinocyte and Lymphoblast Interphase Nuclei. *Experimental Cell Research* 272, 163–175 (2002).
12. Quinodoz, S. A. et al. Higher-Order Inter-chromosomal Hubs Shape 3D Genome Organization in the Nucleus. *Cell* 174, 744–757.e24 (2018).
13. de Guzman Strong, C. et al. A milieu of regulatory elements in the epidermal differentiation complex syntenic block: implications for atopic dermatitis and psoriasis. *Human Molecular Genetics* 19, 1453–1460 (2010).
14. Martin, N. Long-range comparison of human and mouse *Sprr* loci to identify conserved noncoding sequences involved in coordinate regulation. *Genome Research* 14, 2430–2438 (2004).
15. Blanpain, C. & Fuchs, E. Epidermal homeostasis: a balancing act of stem cells in the skin. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 10, 207–217 (2009).
16. Rubin, A. J. et al. Lineage-specific dynamic and pre-established enhancer–promoter contacts cooperate in terminal differentiation. *Nature Genetics* 49, 1522–1528 (2017).
17. Rubin, A. J. et al. Coupled Single-Cell CRISPR Screening and Epigenomic Profiling Reveals Causal Gene Regulatory Networks. *Cell* 176, 361–376.e17 (2019).
18. Ghavi-Helm, Y. et al. Enhancer loops appear stable during development and are associated with paused polymerase. *Nature* 512, 96–100 (2014).
19. Dixon, J. R. et al. Topological domains in mammalian genomes identified by analysis of chromatin interactions. *Nature* 485, 376–380 (2012).
20. Giorgetti, L. et al. Structural organization of the inactive X chromosome in the mouse. *Nature* 535, 575 (2016).

21. Gendrel, A.-V. et al. Smchd1-Dependent and -Independent Pathways Determine Developmental Dynamics of CpG Island Methylation on the Inactive X Chromosome. *Developmental Cell* 23, 265–279 (2012).
22. Nora, E. P. et al. Targeted Degradation of CTCF Decouples Local Insulation of Chromosome Domains from Genomic Compartmentalization. *Cell* 169, 930-944.e22 (2017).
23. Gdula, M. R. et al. The non-canonical SMC protein SmcHD1 antagonises TAD formation on the inactive X chromosome. *bioRxiv* (2018). doi:10.1101/342147
24. Jansz, N. et al. Long-range chromatin interactions on the inactive X and at Hox clusters are regulated by the non-canonical SMC protein Smchd1. *bioRxiv* (2018). doi:10.1101/342212
25. Jansz, N. et al. Smchd1 regulates long-range chromatin interactions on the inactive X chromosome and at Hox clusters. *Nature Structural & Molecular Biology* 25, 766–777 (2018).
26. Wang, C.-Y., Jégou, T., Chu, H.-P., Oh, H. J. & Lee, J. T. SMCHD1 Merges Chromosome Compartments and Assists Formation of Super-Structures on the Inactive X. *Cell* 174, 406-421.e25 (2018).
27. Kohlmaier, A. et al. A Chromosomal Memory Triggered by Xist Regulates Histone Methylation in X Inactivation. *PLoS Biology* 2, e171 (2004).

Michael Gdula