



Wojciech Siwek

**Mechanizmy epigenetyczne w utrzymaniu
aktywnych stanów transkrypcyjnych**

Autoreferat

**Międzynarodowe Centrum Badań nad Szczepionkami
Przeciwnowotworowymi, Uniwersytet Gdański
ul. Kładki 24, 80-822 Gdańsk, Polska**

Gdańsk, 2023

1. Imię i Nazwisko:

Wojciech Siwek

2. Dyplomy i stopnie naukowe:

2/12/2014 **Doktor Nauk Biologicznych w dyscyplinie Biochemia**
(dyplom z wyróżnieniem),
Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej;
Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk;
mentor: Matthias Bochtler

tytuł: "Mechanizm działania enzymu restrykcyjnego R.DpnI zależnego od N6-metyloadeniny"

6/2/2011 **Metody Chemii Analitycznej**, studia podyplomowe,
Uniwersytet Warszawski

3/7/2007 **Magister Biotechnologii**, Uniwersytet Warszawski;
Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk

13/1/2006 **Licencjat z Biotechnologii**, Uniwersytet Warszawski

3. Doświadczenie zawodowe:

2023 – teraz **Adiunkt**, Międzynarodowe Centrum Badań nad
Szczepionkami Przeciwnowotworowymi, Uniwersytet Gdański

2021 - 2023 **Niezależny Pracownik Naukowy** (stypendysta programu Marie
Skłodowska-Curie, Global Fellowship), Wydział Biologii
Molekularnej, Massachusetts General Hospital; Wydział Genetyki,
Harvard Medical School, Boston, USA, mentor: Bob Kingston

- 2020 - 2021 **Pracownik Naukowy**, Wydział Biologii Molekularnej, Massachusetts General Hospital; Wydział Genetyki, Harvard Medical School, Boston, USA, mentor: Bob Kingston
- 2019 - 2020 **Pracownik Naukowy**, Wydział Biochemii, University of Oxford, UK, mentor: Lars Jansen
- 2015 - 2019 **Stypendysta Podoktorski** (stypendium z Fundação para a Ciência e Tecnologia, PT), Instituto Gulbenkian de Ciência, PT, mentor: Lars Jansen
- 2007 - 2014 **Doktorant**, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, mentor: Matthias Bochtler
- 2005 - 2007 **MSc Student**, Instytut Biochemii i Biofizyki, Polskiej Akademii Nauk, mentor: Jacek Hennig
- 2006 - 2006 **Stażysta** (wraz z stypendium), Sainsbury Laboratory, John Innes Centre, Norwich, UK

4. Opis osiągnięcia naukowego:

a. Tytuł osiągnięcia naukowego:

Mechanizmy epigenetyczne w utrzymaniu aktywnych stanów transkrypcyjnych

b. Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe:

1. **Wojciech Siwek***, Sahar S.H. Tehrani, João F. Mata and Lars E.T. Jansen*. (2020) Activation of clustered IFN γ target genes drives cohesin-controlled transcriptional memory. Molecular Cell. doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.005

***Autorzy korespondencyjni**

Impact Factor = 19.328 (Academic Accelerator, 2022-2023), Cytowania = 28 (Google Scholar, 20/09/23), Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki = 200 (2023)

Mój udział w pracy obejmował opracowanie koncepcji badania, a także zaprojektowanie i wykonanie doświadczeń. W szczególności przeprowadziłem pomiary transkryptomu, które doprowadziły do odkrycia grupy genów GBPs (ang. Guanylate Binding Proteins) jako nowych genów pamięci. Następnie, zweryfikowałem obserwację na poziomie RNA i białka, a także w komórkach pierwotnych. Określiłem czas trwania pamięci transkrypcyjnej jak również scharakteryzowałem stochastyczny charakter zjawiska za pomocą sekwencjonowania RNA pojedynczych komórek (scRNA-seq), cytometrii przepływowej oraz FACS (ang. Fluorescence-activated Cell Sorting). Ustaliłem, że transkrypcja jest zbędna dla utrzymania pamięci komórkowej poprzez długoterminowe pomiary RNA i inhibicję Polimerazy RNA II związkami drobnocząsteczkowymi. Wykazałem, że żadna z klasycznych modyfikacji histonów nie jest długoterminowo utrzymywana na genach pamięci. Dodatkowo, ustaliłem, że kluczowe geny pamięci są zlokalizowane w klastrach genomowych i odkryłem nową funkcję regulacyjną kompleksu kohezyny w inicjacji pamięci transkrypcyjnej interferonu gamma (IFN γ). Ponadto przeanalizowałem wygenerowane dane, koordynowałem pracę innych współautorów oraz stworzyłem wszystkie ilustracje i napisałem manuskrypt.

Te odkrycia zostały wyróżnione przez czasopismo Science Immunology: “A cytokine to remember me by”¹ jak i opisane w mediach krajowych, Nauka w Polsce (naukawpolsce.pl): „Jak komórki zapamiętują informacje? Pojawia się nowy trop”²

2. Sahar S.H. Tehrani, Pawel Mikulski, Izma Abdul-Zani, João F. Mata, **Wojciech Siwek***, Lars E.T. Jansen*. (2023) STAT1 is required to establish but not maintain interferon- γ -induced transcriptional memory. EMBO J. doi.org/10.15252/embj.2022112259

***Autorzy korespondencyjni**

Impact Factor = 13.783 (Academic Accelerator, 2022-2023), Cytowania = 3 (Google Scholar, 20/09/23), Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki = 200 (2023)

Mój udział w pracy to: opracowanie koncepcji jak i zainicjowanie badania; dodatkowo zaprojektowałem doświadczenia, zatrudniłem i wyszkoliłem współpracowników, przeprowadziłem analizę wygenerowanych danych, koordynowałem pracę i napisałem pierwszą wersję manuskryptu.

3. **Wojciech Siwek***, Mariluz Gómez-Rodríguez*, Daniel Sobral, Ivan R. Corrêa Jr and Lars E.T. Jansen. (2018) time-ChIP: a method to determine long-term locus-specific nucleosome inheritance. *Methods in Molecular Biology*. doi.org/10.1007/978-1-4939-8663-7_7 ***Równy udział w pracy**

Impact Factor = 0.368 (Academic Accelerator, 2022-2023), Cytowania = 6 (Google Scholar, 20/09/23), Punkty Ministerstwa Edukacji i Nauki = 70 (2023)

Mój udział obejmował przeprowadzenie doświadczeń, w szczególności time-ChIP sprzężonego z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem dla wariantu histonu H3.3 wraz z nałożeniem danych na specyficzne domeny genomu, modyfikacji histonowych (H3K9ac, H3K27ac, H3K9me3 i H3K27me3). Ponadto opracowałem szczegółowy protokół metody (będący częścią publikacji), porównałem nasze podejście do innych istniejących technik oraz napisałem manuskrypt.

Oświadczenia współautorów o indywidualnym udziale w pracy - Załącznik 5

- c. Przegląd celu naukowego, uzyskanych wyników oraz ich potencjalnego zastosowania:

- i. Wstęp

Epigenetyka to proces, który wywodzi się z biologii rozwoju i opisuje dziedziczny fenotyp wynikający ze zmian w komórce, bez zmian w sekwencji DNA³. Mechanizmy epigenetyczne odgrywają kluczową rolę w utrzymywaniu stabilnych stanów ekspresji genów. Dzieje się to podczas rozwoju, jak i w dorosłości. Oznacza to, że komórki wykorzystują te mechanizmy do określenia, czy dane geny powinny być włączone lub wyłączone, co jest niezbędne do budowy różnorodnych tkanek i umożliwia specjalizację komórkową w organizmie. To czyni mechanizmy epigenetyczne fundamentalnymi dla funkcjonowania organizmów wielokomórkowych⁴.

Utrzymanie stanów ekspresji genów jest regulowane przez pętle sprzężenia zwrotnego. Mogą one funkcjonować poprzez elementy działające *in cis* – fragmenty DNA w pobliżu genów, które kontrolują; lub czynniki działające *in trans* – białka regulacyjne zdolne do wiązania się z DNA i aktywacji transkrypcji⁵. Te mechanizmy są tak stabilne, że komórki

zachowują specyficzną ekspresję genów nawet po przejściu przez tak destrukcyjne procesy jak reprogramowanie do komórek macierzystych^{6,7} lub transplantacja jądra do innej cytoplazmy⁸. Innymi słowy, pomimo znaczących zmian lub manipulacji, systemy utrzymujące stany ekspresji genów pozostają zaskakująco stabilne i niezawodne.

Chromatyna to kompleks białka i DNA odpowiedzialny za upakowanie materiału genetycznego. Jest on centralnym elementem kontrolującym utrzymanie represji genów opartym o pętle sprzężenia zwrotnego *in cis*. W tym celu, dedykowane mechanizmy komórkowe są wykorzystywane do odczytywania i kopiowania określonych chemicznych znaczników w celu utrzymania stanu wyciszenia genów podczas cyklu komórkowego – replikacji i mitozy⁹. Przykładami takich mechanizmów epigenetycznych są metylacja DNA w wyspach CpG¹⁰ oraz metylacja histonów: H3K9me (histon 3 lizyna 9)^{11,12} i H3K27me (histon 3 lizyna 27)¹³.

Innym mechanizmem utrzymywania ekspresji genów są pętle sprzężenia zwrotnego oparte o czynniki transkrypcyjne. Mogą one utrzymywać zarówno stany represji jak i aktywacji¹⁴⁻¹⁶. W tych pętlach czynniki transkrypcyjne nie tylko regulują ekspresję genów docelowych, ale także własną. Po pierwotnym uruchomieniu czynnik transkrypcyjny aktywuje transkrypcję własnego genu i w ten sposób utrzymuje programy regulacji genów w nieskończoność¹⁷.

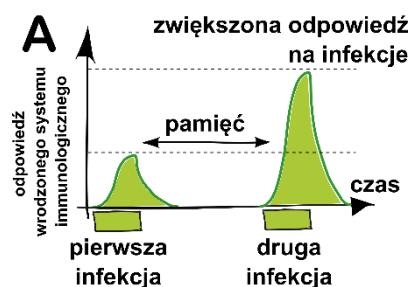
Co zaskakujące, pętle sprzężenia zwrotnego oparte o czynniki transkrypcyjne mogą podtrzymywać aktywne stany ekspresji, ale nie zawsze są do tego niezbędne. Przykładem jest czynnik transkrypcyjny MyoD, zdolny do zmiany stanu zróżnicowania komórek¹⁸. Ekspresja MyoD jest wystarczająca do zróżnicowania fibroblastu w mioblast, ale nie jest wymagana do utrzymania tożsamości komórki mięśniowej – ekspresji genów markerowych mięśnia. Zostało to odkryte przez kontrolowaną mutację genu MyoD w modelu mysim¹⁹. Ta obserwacja sugeruje, że oprócz pętli sprzężenia zwrotnego czynników transkrypcyjnych, inne procesy, być może oparte o mechanizmy *in cis* (jak podczas wyciszania), są zaangażowane w zachowanie aktywnych stanów transkrypcyjnych. Co zaskakujące, takie mechanizmy nie są znane. Ten brak w wiedzy jest wynikiem złożonej natury transkrypcji. Jest to wysoce dynamiczny proces, w którym udział bierze wiele czynników²⁰. Z tego powodu dziedzina epigenetyki koncentruje się prawie wyłącznie na mechanizmach odpowiedzialnych za utrzymywanie represji genów.

Sposobem na rozwiązanie tego problemu i uzyskanie dostępu do nowych procesów *in cis* kontrolujących utrzymywanie aktywnych stanów ekspresji genów jest rozdzielenie procesu transkrypcji od czynników, które zapewniają jej ciągłe działanie. To jednak jest trudne do osiągnięcia doświadczalnie, ponieważ te dwa procesy są ściśle ze sobą powiązane. Aby

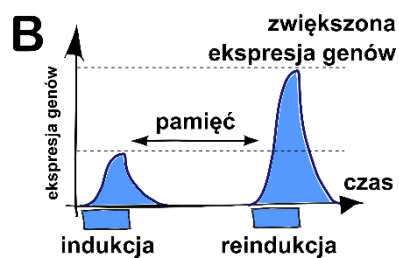
osiągnąć takie rozłączenie i odkryć nowe, oparte na chromatynie mechanizmy epigenetyczne regulujące utrzymanie aktywnych stanów ekspresji, badam zjawisko **wrodzonej pamięci immunologicznej** (*Rycina 1A*). Podczas tego procesu, komórki zarażone patogenem uruchamiają odpowiedź odporności wrodzonej, aby zwalczać zagrożenie. Po ustąpieniu infekcji komórki zapamiętują ten stres. W konsekwencji, jeśli ponownie napotkają bodziec, reagują na niego silniej. Kluczowym aspektem jest, że ten proces nie jest częścią nabytej odpowiedzi immunologicznej, ponieważ efekt trwa tylko kilka miesięcy i nie jest specyficzny dla danego mikroorganizmu²¹. Gospodarz narażony na pewną klasę patogenów wykazuje wzmocnioną odporność również na inne czynniki infekcyjne. Na przykład ekspozycja myszy na β -glukan, cukier pochodzenia grzybicznego, prowadzi do wzmocnionej odporności na bakterię *Staphylococcus aureus*²².

W swojej pracy, po zdobyciu stopnia doktora, badałem wrodzoną pamięć immunologiczną na poziomie ekspresji genów - zjawisko zwane **pamięcią transkrypcyjną** (*Rycina 1B*). Komórki zaindukowane przez dany czynnik, zostają pobudzone. Później, po kilku dniach od początkowej ekspozycji, ponowna stymulacja prowadzi do zwiększonej ekspresji określonych genów²³.

WRODZONA PAMIĘĆ IMMUNOLOGICZNA



PAMIĘĆ TRANSKRYPCYJNA



Rycina 1. Wrodzona pamięć immunologiczna i pamięć transkrypcyjna. (A) Podstawa wrodzonej pamięci immunologicznej: organizm wytwarza odpowiedź odporności wrodzonej i wzmocnioną reakcję po drugiej infekcji. (B) Podstawa pamięci transkrypcyjnej: geny reagują na określony sygnał i po ponownej ekspozycji na ten sam sygnał ulegają silniejszej ekspresji.

Odpowiedź komórkowa na interferony stanowi cenny system modelowy do badania epigenetycznego procesu pamięci transkrypcyjnej²⁴⁻²⁸. W mojej pracy udało mi się opracować niezawodną procedurę do badania tego aspektu, wykorzystując interferon gamma ($IFN\gamma$) jako induktor²⁷. Badanie pamięci transkrypcyjnej z wykorzystaniem $IFN\gamma$ otworzyło przede mną unikatową, dotąd nieznaną możliwość rozdzielenia procesu transkrypcji od komponentów utrzymujących aktywne stany ekspresji genów.

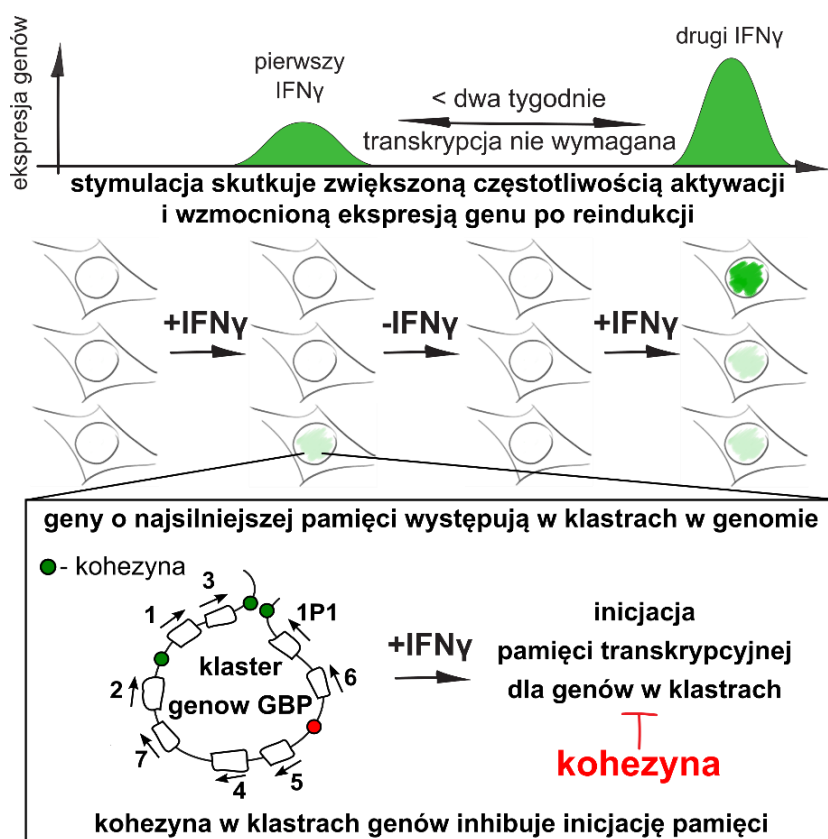
Celem tego osiągnięcia naukowego jest zrozumienie nowych mechanizmów epigenetycznych kontrolujących utrzymanie aktywnych stanów ekspresji genów, poprzez zrozumienie komórkowych i molekularnych aspektów pamięci transkrypcyjnej indukowanej interferonem gamma (IFN γ), a także rozwój nowej metody badania tego problemu.

ii. Szczegółowy opis publikacji zawartych w osiągnięciu naukowym:

Wojciech Siwek*, Sahar S.H. Tehrani, João F. Mata and Lars E.T. Jansen*. (2020) Activation of clustered IFN γ target genes drives cohesin-controlled transcriptional memory.

Molecular Cell. doi.org/10.1016/j.molcel.2020.10.005

*Autorzy korespondencyjni



Rycina 2. Aktywacja genów, skupionych w klastrach w genomie, przez IFN γ prowadzi do, regulowanej kohezyną, inicjacji pamięci transkrypcyjnej. Pamięć transkrypcyjna IFN γ jest utrzymywana przez ponad 14 cykli podziału komórkowego. Ciągły proces transkrypcji nie jest wymagany do utrzymania pamięci. Pamięć transkrypcyjna jest osiągnięta przez zmianę prawdopodobieństwa

zaangażowania wcześniej indukowanych komórek w transkrypcję genów pamięci. Geny wykazujące pamięć transkrypcyjną mają tendencję do lokalizowania się w klastrach, gdzie inicjacja pamięci jest hamowana przez kohezynę.

Podczas pamięci transkrypcyjnej IFN γ , komórki wystawione na działanie cytokiny zapamiętują to doświadczenie i będą silniej reagować na drugą ekspozycję IFN γ . Istotnym elementem tego systemu jest fakt, co pokazały poprzednie prace, że pamięć transkrypcyjna IFN γ jest utrzymywana w nieobecności ekspresji genów pamięci^{24,25} (warte uwagi jest, że te pomiary zostały wykonane jedynie krótko po usunięciu pierwszego sygnału). To sugeruje, że system oferuje unikalną możliwość oddzielenia procesu transkrypcji od czynników utrzymujących ekspresję genów, a tym samym odkrycia nowych mechanizmów, opartych na chromatynie (lub *in cis*), regulujących stabilną ekspresję genów.

Prace z innych laboratoriów pokazały, że gen MHC klasy II, HLA-DRA, ma silny fenotyp pamięci transkrypcyjnej IFN γ w komórkach HeLa²⁴. Co więcej, odkryto korelację pokazującą, że metylacja histonu H3K4 (H3K4me2), Polimeraza RNA II^{24,25}, wariant histonu H3.3 i metylacja histonu H3K36 (H3K36me3)²⁶ są utrzymywane na promotorach genów pamięci po wymyciu pierwszego sygnału. Kluczowe jest jednak, że analogicznie jak dla pomiarów stabilności transkrypcji te doświadczenia wykonano jedynie krótko po usunięciu cytokiny, co uniemożliwia określenie roli tych znaczników w procesie pamięci transkrypcyjnej. Oprócz elementów chromatyny, opisanych powyżej, z procesem związane są jeszcze inne czynniki: Nup98 – składnik poru jądrowego²⁵, a także kompleks mediatora CDK8+²⁹.

W tej pracy naszym celem była dokładna charakterystyka pamięci transkrypcyjnej IFN γ i ustanowienie tego systemu jako modelu do badania tego zjawiska. W konsekwencji odkrycie pętli sprzężenia zwrotnego opartej na chromatynie regulującej utrzymanie aktywnych stanów ekspresji genów.

W początkowym etapie, aby rozszerzyć obserwację pamięci transkrypcyjnej IFN γ poza gen modelowy (HLA-DRA), przeprowadziliśmy analizę transkryptomu (RNA-seq) i w ten sposób odkryliśmy nową rodzinę genów GBP (ang. Guanylate Binding Proteins), która wykazuje silny fenotyp pamięci transkrypcyjnej. GBPs są grupą czynników, które odgrywają rolę w hamowaniu replikacji patogenów wewnątrzkomórkowych³⁰, a także w promowaniu odpowiedzi zapalnej³¹. Spośród zidentyfikowanych genów GBP5 wykazał najmocniejszy efekt pamięci, silniejszy niż wcześniejszy model – HLA-DRA. Zweryfikowaliśmy tę obserwację dla GBP5 metodą ilościowego PCR (RT-qPCR) jak i na poziomie białka przez western blot. Co ważne, odkryliśmy, że pamięć transkrypcyjna IFN γ nie jest specyficzna dla komórek nowotworowych (HeLa), ponieważ prawidłowe fibroblasty, pochodzące z linii pierwotnych, również wykazują ten efekt.

Wcześniej inne laboratoria badały efekt pamięci 48 godzin po usunięciu cytokiny^{24,25}, jednak dokładna długość trwania pamięci nigdy nie została zmierzona, co utrudnia wyciągnięcie mechanistycznych wniosków. Mając to na uwadze, postanowiliśmy określić czas trwania pamięci transkrypcyjnej IFN γ . Stymulowaliśmy komórki HeLa IFN γ , następnie usunęliśmy cytokinę i pozwoliliśmy komórkom rosnąć przez kilka dni. W kolejnym kroku, pobraliśmy komórki (po reindukcji) do analizy białka i RNA. Odkryliśmy, że pamięć trwa ponad 14 dni, co jest równoważne wielu cyklom podziału komórki. Po tym czasie komórki wracają do swojego pierwotnego, niepobudzonego stanu. Nasze badania pokazały, że pamięć transkrypcyjna indukowana przez IFN γ jest długotrwała, ale nie permanentna.

Następnie scharakteryzowaliśmy efekt pamięci transkrypcyjnej IFN γ na poziomie komórkowym wykonując doświadczenie sekwencjonowania transkryptomów pojedynczych komórek (scRNA-seq). Nasze odkrycia ujawniły, że zjawisko pamięci transkrypcyjnej jest wynikiem dwóch połączonych procesów: (1) zwiększonej transkrypcji genu – większej liczby cząsteczek mRNA na komórkę; oraz (2) zwiększonego prawdopodobieństwa transkrypcji genu – większej liczby komórek biorących udział w ekspresji genu po ponownej stymulacji. Istotne jest, że drugi aspekt (zwiększone prawdopodobieństwo ekspresji) ma znacznie większy ogólny wpływ na pamięć transkrypcyjną. Zweryfikowaliśmy nasze spostrzeżenia poprzez inżynierię linii komórkowej – wstawienie kasety GFP w gen GBP5. Za pomocą tego narzędzia i analizy cytometrycznej potwierdziliśmy, że głównym efektem pamięci transkrypcyjnej IFN γ jest rzeczywiście zmiana prawdopodobieństwa zaangażowania komórek w transkrypcję po początkowej stymulacji, a nie wzmocniona transkrypcja genu GBP5 w pojedynczej komórce. Ponadto, używając stworzonej linii komórkowej, przeprowadziliśmy doświadczenie śledzenia komórek metodą FACS (ang. Fluorescence-Activated Cell Sorting). Odkryliśmy, że komórki, które w początkowej stymulacji angażowały się w transkrypcję, mają większą szansę na ekspresję GBP5 po ponownej stymulacji. Nasze badania pokazały, że zmiana prawdopodobieństwa ekspresji genu pamięci po wcześniejszej indukcji jest głównym motorem pamięci transkrypcyjnej.

Następnie postanowiliśmy sprawdzić, czy proces transkrypcji jest wymagany do utrzymania pamięci transkrypcyjnej. Chcieliśmy zbadać, czy nawet minimalne poziomy transkrypcji mogą być wystarczające, aby utrzymać geny w stanie gotowości do reaktywacji. Aby to określić, przeprowadziliśmy następujące doświadczenie. Stymulowaliśmy komórki IFN γ , a następnie usunęliśmy cytokinę. Po kilku dniach pobieraliśmy próbki (komórki bez drugiej indukcji). Dokładnym i czułym pomiarem ilościowego PCR (RT-qPCR) odkryliśmy, że ekspresja genów pamięci (GBP5 i HLA-DRA) powraca do poziomu bazowego po usunięciu

IFN γ . Aby rozszerzyć nasze obserwacje na inne geny, zastosowaliśmy inhibitor Polimerazy RNA II (triptolid), aby sprawdzić, czy globalna transkrypcja jest ważna w utrzymaniu pamięci – co jest charakterystyczne dla pętli sprzężenia zwrotnego czynników transkrypcyjnych. Po stymulacji IFN γ potraktowaliśmy komórki inhibitorem i przeprowadziliśmy pomiar RT-qPCR. Odkryliśmy, że globalna transkrypcja nie jest wymagana do utrzymania pamięci transkrypcyjnej IFN γ , co dodatkowo sugeruje obecność mechanizmów regulacyjnych opartych na chromatynie.

Aby określić, jakie właściwości chromatyny mogą odgrywać rolę w utrzymaniu pamięci transkrypcyjnej, przeprowadziliśmy analizę genomową w zakresie dostępności chromatyny (ATAC-seq) jak i obecności określonych czynników lub modyfikacji (ChIP-seq): Polimeraza RNA II, wariant histonu H3.3 i modyfikacje histonów: H3K27ac, H3K36me3, H3K79me2, H3K4me2. Ustaliliśmy, że żaden z tych markerów nie jest utrzymywany na genach pamięci długoterminowo po usunięciu IFN γ . Godny uwagi wyjątek stanowi H3K4me2, który wykryliśmy na genach pamięci 2, ale nie 7 dni po usunięciu cytokiny. Biorąc pod uwagę nasze odkrycie, że pamięć może trwać 14 dni, jest mało prawdopodobne, że badane czynniki i modyfikacje odgrywają kluczową rolę w utrzymaniu pamięci transkrypcyjnej. Nasze dane przeczą wcześniejszym doniesieniom określającym badane modyfikacje jako kluczowe dla pamięci transkrypcyjnej^{24–26}.

W konsekwencji otrzymania danych negatywnych, postanowiliśmy zmienić nasze podejście i przyjrzeć się bliżej pozycjom genów pamięci w genomie. Zauważyliśmy, że geny wykazujące silną pamięć transkrypcyjną znajdują się w klastrach, sąsiadują ze sobą na DNA. To sugeruje, że pojedynczy mechanizm pamięci może regulować wiele genów. Przykładem takiego mechanizmu jest kontrolowany w rozwoju klastery genów globiny. W tym przypadku pojedynczy region regulacyjny determinuje ekspresję określonego genu globinowego w zależności od stadium rozwoju³². Aby sprawdzić, czy podobny mechanizm może kontrolować klastry genów pamięci, postanowiliśmy skoncentrować się w naszych badaniach na kompleksie kohezyny. Kohezyna to kluczowy czynnik białkowy regulujący zwijanie się genomu³³. W celu globalnego usunięcia kohezyny, a więc rozwinięcia genomu, użyliśmy technologii degronu indukowanego auxyną³⁴. Odkryliśmy, że to poważne zaburzenie materiału genetycznego komórki nie ma wpływu na utrzymanie pamięci transkrypcyjnej IFN γ .

Następnie postanowiliśmy sprawdzić, czy zwijanie genomu odgrywa rolę w inicjacji pamięci transkrypcyjnej IFN γ . W tym celu, usunęliśmy kohezynę tuż przed pierwszą indukcją i przetestowaliśmy wpływ perturbacji na pamięć za pomocą RNA-seq. Co zaskakujące, zaobserwowaliśmy wzmocnioną reakcję genów pamięć w klastrach: MHC klasy II i GBP. Aby

lepiej zrozumieć tą obserwację, potwierdzić, że kohezyna reguluje inicjację pamięci lokalnie, a nie przez niespecyficzny efekt globalnego usunięcia; przeprowadziliśmy eksperyment ChIP-seq w celu wykrycia pozycji genomowych kohezyny w pobliżu klastra GBP. Uzyskana wiedza umożliwiła nam usunięcie kilku miejsc wiązania kohezyny z pobliskiego obszaru GBP przez wycięcie metodą CRISPR-Cas9. Następnie, zmierzaliśmy wpływ perturbacji na pamięć genów GBP i MHC klasy II. Zidentyfikowaliśmy pojedyncze miejsca wiązania kohezyny w klastrze GBP, które hamuje inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN γ , ale tylko lokalnie w genach GBP, a nie w drugim klastrze pamięci – MHC klasy II.

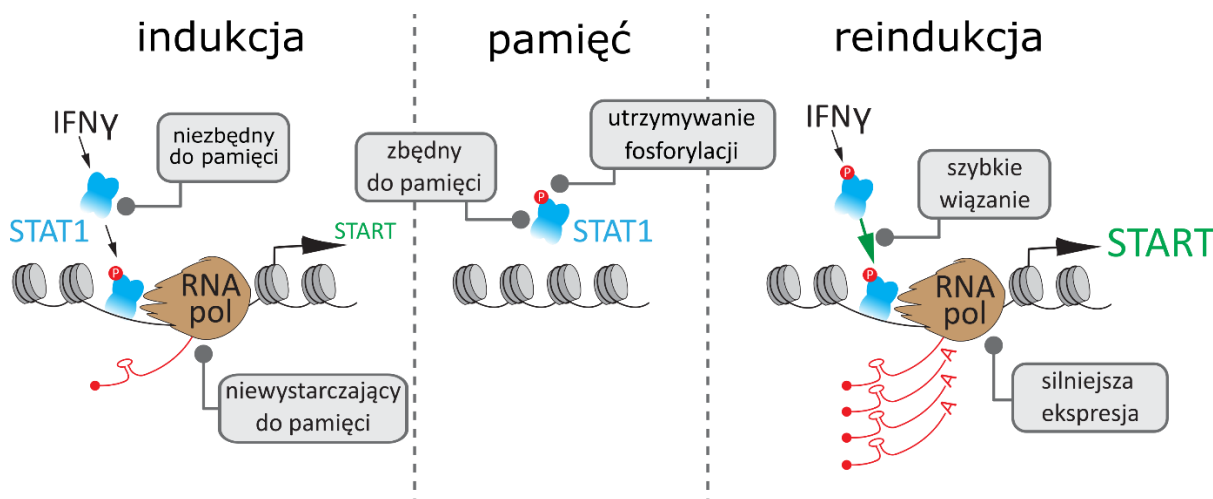
Podsumowując, opracowaliśmy wydajny system do badania pamięci transkrypcyjnej IFN γ , oparty na nowym modelowym genie pamięci – GBP5. Poza tym, określiliśmy, że efekt pamięci występuje zarówno w komórkach nowotworowych jak i prawidłowych. Dodatkowo, szczegółowo scharakteryzowaliśmy to zjawisko: określiliśmy długość pamięci i jej stochastyczny charakter. Co więcej, odkryliśmy molekularny mechanizm kontrolujący inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN γ (*Rycina 2*).

Ponadto ustaliliśmy, że pamięć transkrypcyjna IFN γ jest specyficznym procesem kontrolowanym lokalnie. Wskazują na to dwa dowody. (1) Inicjacja pamięci transkrypcyjnej nie jest zależna jedynie od szlaku przekazywania sygnału, ponieważ tylko mała liczba genów reagujących na IFN γ wykazuje pamięć, mimo że kilka tysięcy jest indukowanych przez cytokinę. (2) Eliminacja miejsca wiązania kohezyny (kompleksu białek odpowiedzialnego za zwijanie genomu) w pobliżu genów GBP prowadzi do wzmocnienia tworzenia pamięci tych genów, ale nie genów MHC klasy II, zlokalizowanych w innym miejscu w genomie.

Najważniejsze w tej pracy jest to, że wykazaliśmy, iż pamięć transkrypcyjna IFN γ nie jest pętlą sprzężenia zwrotnego czynników transkrypcyjnych, ponieważ: (1) pamięć nie jest permanentna; (2) nie wykryliśmy indukcji i stabilnej ekspresji żadnych czynników transkrypcyjnych; (3) nie wykryliśmy stabilnie otwartej chromatyny po usunięciu IFN γ (cechy charakterystycznej dla wiązania czynników transkrypcyjnych); i wreszcie (4) transkrypcja nie jest wymagana do utrzymania pamięci.

Sahar S.H. Tehrani, Pawel Mikulski, Izma Abdul-Zani, João F. Mata, **Wojciech Siwek***, Lars E.T. Jansen*. (2023) STAT1 is required to establish but not maintain interferon- γ -induced transcriptional memory. EMBO J. doi.org/10.15252/embj.2022112259

*Autorzy korespondencyjni



Rycina 3. STAT1 jest wymagany do inicjacji, ale nie do utrzymania pamięci transkrypcyjnej indukowanej IFN γ . Transkrypcja nie jest wystarczająca do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. STAT1 jest niezbędny do inicjacji, ale nie do utrzymania pamięci transkrypcyjnej. Fosforylacja STAT1 w pozycji S727 jest utrzymywana wiele dni po wymyciu IFN γ . Reindukcja IFN γ skutkuje szybszym wiązaniem STAT1 i IRF1 do genów pamięci.

Proces inicjacji pamięci transkrypcyjnej nie jest w pełni poznany. Rola czynników transkrypcyjnych w pamięci transkrypcyjnej została określona w systemach roślinnych^{35,36} i drożdżowych^{29,37}, ale nie u ssaków. Bogata literatura opisuje parę dedykowanych czynników transkrypcyjnych (STAT1 i IRF1), które pracują w sposób kaskadowy, regulując sygnalizację IFN γ ³⁸. Przy związaniu IFN γ z receptorem, aktywowany jest czynnik transkrypcyjny STAT1. Odbywa się to przez jego fosforylację³⁸. Aktywacja STAT1 prowadzi następnie do ekspresji wtórnego czynnika transkrypcyjnego znanego – IRF1. Udział IRF1 dodatkowo pogłębia reakcje komórki na IFN γ ³⁹.

W tym badaniu, wykorzystaliśmy opracowany przez nas system pamięci transkrypcyjnej IFN γ , aby zrozumieć rolę transkrypcji i specyficzne funkcje kluczowych

rodzin czynników transkrypcyjnych, STAT i IRF, w inicjacji i utrzymaniu pamięci transkrypcyjnej.

W pierwszym kroku, aby przetestować, czy sam proces transkrypcji genu jest wystarczający do ustanowienia pamięci transkrypcyjnej IFN γ , postanowiliśmy ominąć szlak sygnalizacji IFN γ , aktywując gen pamięci za pomocą narzędzia biologii syntetycznej – CRISPRa-SAM (ang. CRISPR-Cas9 Synergistic Activation Mediator)⁴⁰. Ustaliliśmy warunki aktywacji genu pamięci GBP1 i odkryliśmy, że proces transkrypcji nie jest wystarczający do ustanowienia pamięci. Oznacza to, że w tym przypadku do inicjacji pamięci transkrypcyjnej wymagany jest system specyficzny dla szlaku sygnalizacji IFN γ .

Aby lepiej zrozumieć, jak kontrolowane są geny pamięci, przeprowadziliśmy kinetyczny pomiar otwartości chromatyny (ATAC-seq), w celu określenia różnic w prędkości aktywacji promotorów genów wykazujących pamięć podczas indukcji i reindukcji. Zgodnie z naszymi oczekiwaniami, zaobserwowaliśmy, że chromatyna wokół genów pamięci otwiera się szybciej, gdy komórki są reaktywowane w porównaniu z pierwszą aktywacją.

Następnie, aby zrozumieć jakie czynniki transkrypcyjne mogą odgrywać rolę w pamięci, za pomocą mutagenyzy CRISPR-Cas9, przeanalizowaliśmy serię kandydatów z rodzin STAT i IRF (STAT1, STAT2, STAT3, STAT5B, IRF1, IRF9). Określiliśmy, że STAT1 i IRF1 są kluczowe w aktywacji genu GBP5. W kolejnym kroku, przeprowadziliśmy eksperyment kinetyczny CUT&RUN⁴¹. Metoda pozwoliła nam śledzić prędkość wiązania STAT1 i IRF1 przy indukcji i reindukcji IFN γ . Zaobserwowaliśmy, że w reaktywacji STAT1 i IRF1 były rekrutowane w szybszym tempie w porównaniu z pierwotną aktywacją.

Na kolejnym etapie, skupiliśmy się na STAT1 – pierwszym czynniku transkrypcyjnym szlaku sygnalizacji IFN γ ³⁸. W naszych wcześniejszych badaniach zaobserwowaliśmy, że stymulacja IFN γ pobudza ekspresję genu STAT1²⁷. To skłoniło nas do rozważenia czy pamięć może być regulowana na poziomie transkrypcji genu STAT1. Aby sprawdzić tą hipotezę, zmutowaliśmy STAT1, a następnie wprowadziliśmy go z powrotem do komórki pod konstytutywnym promotorem. W ten sposób, ustaliliśmy, że regulacja transkrypcyjna STAT1 nie ma wpływu na pamięć transkrypcyjną IFN γ .

Aby dodatkowo zbadać wpływ indukcji komórek przez IFN γ na STAT1, stworzyliśmy linię komórkową poprzez wprowadzenie do genu STAT1 kasety GFP. Wykorzystaliśmy to narzędzie do pomiaru prędkości importu STAT1 do jądra komórkowego w trakcie indukcji i reindukcji IFN γ . Odkryliśmy, że import STAT1 przebiega z taką samą prędkością w obu warunkach.

Następnie skupiliśmy się na zrozumieniu roli fosforylacji STAT1 w kontekście pamięci transkrypcyjnej. Na początek, fosforylacji STAT1 na tyrozynie, w pozycji 701 (Y701)³⁸. Ta modyfikacja jest kluczowa dla aktywacji STAT1. Aby zrozumieć rolę tej fosforylacji w utrzymaniu pamięci, zastosowaliśmy specyficzny inhibitor, związek drobnocząsteczkowy. Jest on w stanie inhibować aktywność kinazy JAK, która odpowiada za fosforylację STAT1 w pozycji Y701³⁸. Potraktowaliśmy komórki tym związkiem w czasie pamięci – okresie następującym po indukcji. Dowiedliśmy, że zapobieganie fosforylacji STAT1 w oknie pamięci transkrypcyjnej nie miało znaczącego wpływu na jej utrzymywanie.

Poza fosforylacją w pozycji Y701, STAT1 jest również fosforylowany na Serynie 727 (S727). Ta modyfikacja jest niezbędna do pełnej aktywności tego czynnika transkrypcyjnego⁴². Zaskoczeniem było nasze odkrycie, że fosforylacja STAT1 727 jest utrzymywana długo po usunięciu IFN γ . To było nieoczekiwane, ponieważ typowe zdarzenia fosforylacji mają tendencję do szybkiego zanikania po usunięciu bodźca, który je wywołuje. Aby sprawdzić, czy ta fosforylacja STAT1 odgrywa rolę w utrzymaniu pamięci transkrypcyjnej IFN γ , zaprojektowaliśmy linię komórkową w której gen STAT1 został zmodyfikowany degenem dTAG⁴³. Umożliwiło nam to tymczasowe usunięcie STAT1 po dodaniu specyficznego związku drobnocząsteczkowego. Odkryliśmy, że usunięcie STAT1 po pierwszej indukcji nie wpływa na utrzymanie pamięci transkrypcyjnej. To sugeruje, że stabilna fosforylacja STAT1 w pozycji 727 lub jakakolwiek inna stabilna modyfikacja STAT1 nie jest kluczowym czynnikiem odpowiedzialnym za utrzymywanie pamięci transkrypcyjnej. Warto podkreślić, że fosforylacja STAT1 w pozycji 727 lub inna modyfikacja może nadal odgrywać ważną rolę w przypadku dynamicznego dodawania znacznika.

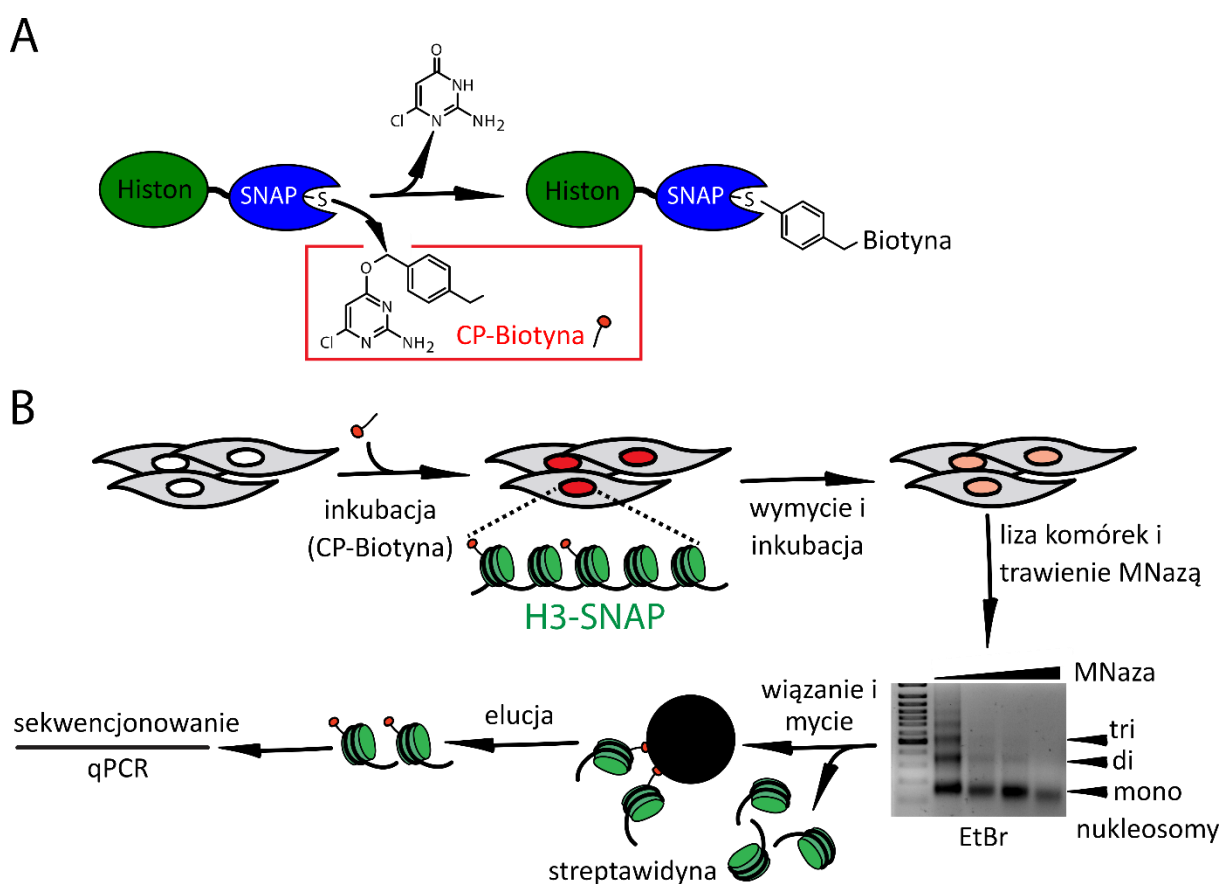
Dodatkowo, wykorzystaliśmy linię komórkową STAT1 dTAG, aby określić, czy STAT1 jest wymagany do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. Podczas fazy indukcji tymczasowo usunęliśmy STAT1 z komórek za pomocą systemu dTAG. Odkryliśmy, że STAT1 jest niezbędny do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. To, wraz z obserwacją, że sama transkrypcja nie jest wystarczająca, czyni STAT1 kluczowym, specyficznym czynnikiem w inicjacji pamięci transkrypcyjnej IFN γ .

Podsumowując, w tej pracy pokazaliśmy, że sam proces transkrypcji nie jest wystarczający, aby zainicjować pamięć. Ustaliliśmy, że STAT1 i IRF1 odgrywają kluczowe role w regulacji genów GBP. Scharakteryzowaliśmy kinetyczną odpowiedź komórek na poziomie molekularnym na indukcję i reindukcję IFN γ oraz pokazaliśmy zwiększoną szybkość rekrutacji STAT1 i IRF1 przy reindukcji. Zbadaliśmy odpowiedź STAT1 w pamięci transkrypcyjnej oraz odkryliśmy, że fosforylacja STAT1 S727 jest utrzymywana długo po

wypłukaniu IFN γ . Mimo tego, zaobserwowaliśmy, że stabilne utrzymywanie modyfikacji na STAT1 nie jest niezbędne do utrzymywania pamięci. Wreszcie odkryliśmy, że STAT1 jest fundamentalny dla inicjacji pamięci transkrypcyjnej IFN γ (Rycina. 3).

Wojciech Siwek*, Mariluz Gómez-Rodríguez*, Daniel Sobral, Ivan R. Corrêa Jr and Lars E.T. Jansen. (2018) time-ChIP: a method to determine long-term locus-specific nucleosome inheritance. *Methods in Molecular Biology*. doi.org/10.1007/978-1-4939-8663-7_7

* Równy udział w pracy



Rycina 4. time-ChIP: metoda do określania długoterminowego dziedziczenia nukleosomów specyficznych dla danego locus. (A) Schemat reakcji enzymu SNAP z CP-Biotyną, w wyniku której dochodzi do kowalencyjnego wyznaczenia znacznika SNAP biotyną przez reaktywną cysteinę (S). (B) Schemat doświadczenia time-ChIP. Komórki produkujące histon z dołączonym znacznikiem SNAP są inkubowane z CP-Biotyną. Następnie, substancja jest wmywana a po pewnym czasie część znakowanych histonów ulega wymianie w nukleosomach. W określonych momentach komórki są lizowane, izoluje się jądra i uwalnia chromatynę z

użyciem MNazy. Biotynolowane nukleosomy są izolowane, oczyszczane na złożu streptawidynowym i poddawane analizie ilościowego PCR (qPCR) lub sekwencjonowaniu wysokoprzepustowemu.

Nukleosom jest podstawowym elementem budującym chromatynę, która odgrywa kluczową rolę w utrzymywaniu stabilnych stanów ekspresji genów. Jest to osiągane poprzez różne mechanizmy, w tym obecność określonych wariantów histonów i ich modyfikacji⁴⁴. Aby zrozumieć, w jaki sposób histony mogą działać jako nośniki informacji epigenetycznej, konieczne jest zrozumienie ich dynamiki w odniesieniu do cyklu komórkowego.

Istnieje kilka metod pomiaru dynamiki nukleosomów z informacją o ich położeniu w genomie (kinetyka histonów dla określonych loci). Poniżej omówię dwie kluczowe techniki.

CATCH-IT (ang. Covalent Attachment of Tags to Capture Histones and Identify Turnover)⁴⁵ opiera się na krótkim wyznakowaniu (podczas translacji) endogennych białek. Nowo tworzony proteom jest wyznakowany za pomocą azidohomoalaniny, związku chemicznego będącego analogiem metioniny. Następnie, po pewnym czasie przeprowadza się chemiczne przyłączenie biotyny, po której następuje izolacja chromatyny i oczyszczenie wyznakowanych histonów z wykorzystaniem streptawidyny. To, w połączeniu z sekwencjonowaniem wysokoprzepustowym, daje dane kinetyczne wiązania histonów w danym miejscu genomu. Ta metoda dostarcza cennych informacji na temat tego, jak szybko histony są zastępowane w określonych loci. Wadą tego podejścia jest to, że nie pozwala analizować dynamiki specyficznych wariantów histonów. Co więcej, ponieważ ta metoda opiera się na pomiarach dynamiki nowo powstałych białek, nie nadaje się do wykrywania stabilnych puli nukleosomów.

RITE (ang. Recombination Induced Tag Exchange)⁴⁶ umożliwia pomiar kinetyczny specyficznych histonów. Zasada RITE polega na wykorzystaniu wersji wariantu histonu, do którego, poprzez inżynierię genetyczną, przyłączony jest znacznik, co umożliwia łatwą identyfikację histonu. Dodatkowo, ta specyficzna modyfikacja genu histonu umożliwia wymianę znacznika na inny po aktywacji przez enzym rekombinazę Cre. Ta wymiana jest genetyczna, co oznacza trwałą⁴⁶. Jedną z fundamentalnych wad systemu RITE jest to, że wykazuje on opóźnioną reakcję na indukcję rekombinazy Cre. Enzym musi zostać aktywowany i dokonać katalitycznej reakcji w genomie, następnie zmodyfikowany gen histonu musi ulec transkrypcji, translacji i inkorporacji do chromatyny. Oznacza to, że proces wymiany znaczników nie następuje natychmiast po indukcji, co wprowadza opóźnienie w pomiarze kinetycznym.

Celem naszej pracy było ustanowienie nowatorskiej metody pomiaru długoterminowej dynamiki nukleosomów w skali całego genomu z wysoką rozdzielczością, która rozwiązuje wyżej opisane problemy.

Kluczowym elementem naszej metody jest enzym SNAP zdolny do katalitycznego samo znakowania. SNAP można poddać znakowaniu w żywych komórkach. Zwyczajowo wykorzystywane są do tego barwniki fluorescencyjne⁴⁷. My zmodyfikowaliśmy to podejście opracowując strategię znakowania SNAP biotyną a następnie oczyszczania SNAP-histonów na podłożu ze streptawidyną (*Rycina 4A*). To pozwala nam na izolację i bezpośredni pomiar retencji histonów w chromatynie w określonych loci, w komórkach ludzkich. Nazwaliśmy tę metodę **time-ChIP**, ponieważ strategia jest analogiczna do doświadczenia immunoprecypitacji chromatyny (ChIP) z dodanym komponentem czasowym, w celu określenia dynamiki nukleosomów.

Biotynylację SNAP można przeprowadzić za pomocą komercyjnie dostępnego związku chemicznego – BG-Biotyny (New England Biolabs). Jednak w celu poprawienia wydajności reakcji opracowaliśmy udoskonalony substrat CP-Biotynę. Umożliwiło to bardziej wydajną i specyficzną biotynylację SNAP w chromatynie w żywych komórkach.

Aby przeprowadzić pomiary dynamiki chromatyny metodą time-ChIP, żywe komórki eksprymujące fuzje histonów-SNAP są krótko-terminowo znakowane substratem biotyny. Następnie nadmiar związku jest wypłukiwany, a komórki pozostają w hodowli, aby umożliwić wymianę histonów w nukleosomach. W następnej kolejności, chromatyna jest izolowana i enzymatycznie fragmentowana za pomocą MNazy. Wyznakowane nukleosomy są następnie izolowane na podłożu ze streptawidyną. Z tak otrzymanych nukleosomów izolowane jest DNA do pomiaru w ilościowym PCR (qPCR) lub wysokoprzepustowym sekwencjonowaniu (*Rycina. 4B*).

W serii doświadczeń typu „proof-of-concept” połączyliśmy time-ChIP z qPCR dla wariantu histonu H3.1-SNAP i wykazaliśmy, że histon H3.1 może być utrzymywany na konkretnym DNA nawet podczas intensywnej transkrypcji lub replikacji. Dodatkowo wykorzystaliśmy metodę time-ChIP w połączeniu z wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem dla wariantu histonu H3.3-SNAP. Wybraliśmy ten wariant, ponieważ ma on znany charakterystyczny rozkład w genomie związany z aktywnością genów⁴⁸. Następnie połączyliśmy nasze dane z informacją o aktywnych (H3K9ac, H3K27ac) i nieaktywnych (H3K9me3, H3K27me3) częściach genomu. Pokazaliśmy, że szybka wymiana histonów koreluje z aktywnymi częściami genomu, co wskazuje, że nasza fuzja histonu H3.3-SNAP zachowuje się zgodnie z oczekiwaniami. To pokazuje, że metodą time-ChIP w połączeniu z

wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem możemy uzyskać wgląd w dynamikę chromatyny dla specyficznego locus w genomie.

Podsumowując, w tej pracy opisaliśmy nową metodę wraz ze szczegółowym protokołem, zwaną time-ChIP. Umożliwia ona pomiar lokalnej dynamiki i dziedziczenia histonów za pomocą ilościowego PCR oraz wysokoprzepustowego sekwencjonowania. Time-ChIP rozwiązuje problemy charakterystyczne dla innych analogicznych podejść. Bazuje na inżynierii genetycznej, dzięki czemu umożliwia pomiary dla określonych wariantów histonów. Umożliwia znakowanie białka po jego translacji, dzięki czemu może być wykorzystywany do pomiaru dynamiki długoterminowej. Wreszcie, reakcja SNAP jest procesem szybkim, co eliminuje opóźnienia w odpowiedzi na znakowanie. Główną wadą time-ChIP jest niska wydajność znakowania biotyną (ze względu na ograniczoną przepuszczalność błony komórkowej), co wymaga użycia dużej liczby komórek. Problem ten częściowo rozwiązaliśmy, opracowując ulepszony substrat dla SNAP (CP-Biotyna).

iii. Podsumowanie wyników osiągnięcia naukowego

Podsumowując, w tym osiągnięciu naukowym opracowaliśmy wydajny system, oparty na stymulacji ludzkich komórek IFN γ , do badania ważnego zjawiska epigenetycznego – jakim jest pamięć transkrypcyjna. Scharakteryzowaliśmy to zjawisko szczegółowo na poziomie komórkowym i ustaliliśmy, że pamięć transkrypcyjna IFN γ nie jest utrzymywana przez sprzężenie zwrotne czynników transkrypcyjnych, a zatem najprawdopodobniej jest kontrolowana przez chromatynę. Co więcej, odkryliśmy, że pamięć transkrypcyjna IFN γ jest regulowana lokalnie, pokazaliśmy, że kompleks kohezyny hamuje inicjację pamięci *in cis*. Dodatkowo ustaliliśmy, że sama transkrypcja nie jest wystarczająca do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. Ponadto zidentyfikowaliśmy kluczowe czynniki transkrypcyjne uczestniczące w tym zjawisku i wykazaliśmy, że STAT1 jest wymagany do inicjacji pamięci transkrypcyjnej. Odkryliśmy również posttranslacyjną modyfikację STAT1, która utrzymuje się długo po usunięciu IFN γ .

Ponadto, opracowaliśmy nową metodę, długoterminowego pomiaru dynamiki nukleosomów, w skali całego genomu, w żywych komórkach, zwaną time-ChIP. Procedura może być połączona z ilościowym PCR lub wysokoprzepustowym sekwencjonowaniem. Technika time-ChIP oparta jest na inżynierii genetycznej, dzięki czemu można go wykorzystać do pomiaru dynamiki określonych wariantów histonów. Potwierdziliśmy działanie tej metody

dokonując pomiarów dynamiki wariantu histonu H3.3 i połączeniu tych wyników z informacją o aktywnych i nieaktywnych częściach genomu.

iv. Wyniki ponad osiągnięcie naukowe

Oprócz wyników przedstawionych w ramach tego osiągnięcia naukowego, badam pamięć transkrypcyjną IFN γ za pomocą dwóch sposobów.

Pierwszy oparty jest na hipotezie. Tu skupiłem się na identyfikacji właściwości chromatyny, która korelowałaby z określonym czasem trwania pamięci²⁷. Skoncentrowałem się na badaniu modyfikacji H3K4me (metylacja lizyny 4 na histonie 3), ponieważ silnie koreluje z transkrypcją⁴⁹ i wykazano, że (H3K4me2, dimetylacja) jest zaangażowana w pamięć transkrypcyjną^{24,25,50}. Przeprowadziłem analizę chromatyny dla komórek nie indukowanych, indukowanych oraz 7 dni po usunięciu IFN γ . Zaobserwowałem, że H3K4me1 (monometylacja) jest utrzymywany przez co najmniej tydzień na genie pamięci, w przeciwieństwie do H3K4me3 (trimetylacja) i me2 (dimetylacja), które są tracone znacznie szybciej (dane niepublikowane). Jest to w zgodzie z wynikami z laboratorium Gioacchino Natoli, gdzie wykazano, że H3K4me1 koreluje z obecnością tzw. utajonych enhancerów w komórkach makrofagów⁵¹. Moja obserwacja doprowadziła do hipotezy, że elementy *cis* bogate w H3K4me1 w pobliżu genów pamięci są kluczowe dla utrzymania pamięci transkrypcyjnej IFN γ .

W ramach alternatywnego podejścia, nie opartego na hipotezie, przeprowadziłem jako niezależny stypendysta Marie Skłodowskiej-Curie w Massachusetts General Hospital, Harvard Medical School przesiew genetyczny w skali całego genomu. Wykorzystałem do tego celu narzędzie CRISPR-Cas9. W ten sposób, zidentyfikowałem potencjalne czynniki regulujące utrzymanie, ale także inicjację pamięci transkrypcyjnej IFN γ .

Obecnie aktywnie rozwijam obie te ścieżki badawcze jako adiunkt w Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi na Uniwersytecie Gdańskim.

v. Plany na przyszłość oraz potencjalne zastosowania otrzymanych wyników

Moim głównym celem w odniesieniu do pamięci transkrypcyjnej IFN γ jest zrozumienie, w jaki sposób ten proces działa mechanistycznie na poziomie molekularnym. Jak

inicjowana jest pamięć transkrypcyjna i jak jest ona utrzymywana długoterminowo? Jestem przekonany, że dzięki narzędziom, wiedzy i wynikom wstępnym, które do tej pory wygenerowałem, będę w stanie odpowiedzieć na fundamentalne pytanie w epigenetyce: w jaki sposób mechanizmy regulacyjne oparte na chromatynie utrzymują aktywne stany transkrypcyjne.

Zamierzam ponadto bardziej szczegółowo poznać mechanizmy pamięci transkrypcyjnej w badaniach na monocytach izolowanych z próbek klinicznych. Wierzę, że to otworzy drogę dla nowych technologii biomedycznych. Monocyty wykazują silną wrodzoną pamięć immunologiczną⁵². Dodatkowo mogą różnicować do makrofagów lub komórek dendrytycznych⁵³. Te dwa rodzaje komórek są obecne we wszystkich tkankach organizmu⁵⁴, są kluczowe w stanach zapalnych i gojeniu ran⁵⁵, jak również koordynują adaptacyjną odpowiedź układu immunologicznego poprzez prezentację antygenów limfocytom T⁵⁶. Wierzę, że wyniki moich badań otworzą nowe możliwości manipulacji wrodzonym układem odpornościowym. To utoruje drogę do współpracy z przemysłem, stworzenia nowych miejsc pracy w sektorze biotechnologicznym i nowych immunoterapii.

**Uzyskanie stopnia doktora habilitowanego umożliwi mi rekrutację doktorantów
i prace nad zrealizowaniem wyżej wymienionych celów.**

vi. Bibliografia

1. Halawi, A. & Griffin, G. K. A cytokine to remember me by. *Sci Immunol* **5**, (2020).
2. How do cells memorize information? A new lead | Science in Poland. <https://scienceinpoland.pl/en/news/news%2C84826%2Cchow-do-cells-memorize-information-new-lead.html>.
3. Berger, S. L., Kouzarides, T., Shiekhattar, R. & Shilatifard, A. An operational definition of epigenetics. *Genes Dev* **23**, 781 (2009).
4. Kiefer, J. C. Epigenetics in development. *Developmental Dynamics* **236**, 1144–1156 (2007).
5. Allis, C. D., Caparros, M.-L., Jenuwein, T. & Reinberg, D. *Epigenetics*. (Cold Spring Harbor Laboratory Press., 2015).
6. Polo, J. M. *et al.* Cell type of origin influences the molecular and functional properties of mouse induced pluripotent stem cells. *Nature Biotechnology* **28**:8 **28**, 848–855 (2010).
7. Ghosh, Z. *et al.* Persistent Donor Cell Gene Expression among Human Induced Pluripotent Stem Cells Contributes to Differences with Human Embryonic Stem Cells. *PLoS One* **5**, e8975 (2010).

8. Ng, R. K. & Gurdon, J. B. Epigenetic memory of active gene transcription is inherited through somatic cell nuclear transfer. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 1957–1962 (2005).
9. Margueron, R. & Reinberg, D. Chromatin structure and the inheritance of epigenetic information. *Nat Rev Genet* **11**, 285–296 (2010).
10. Smith, Z. D. & Meissner, A. DNA methylation: roles in mammalian development. *Nat Rev Genet* **14**, 204–20 (2013).
11. Lachner, M., O’Carroll, D., Rea, S., Mechtler, K. & Jenuwein, T. Methylation of histone H3 lysine 9 creates a binding site for HP1 proteins. *Nature* **410**, 116–120 (2001).
12. Bannister, A. J. *et al.* Selective recognition of methylated lysine 9 on histone H3 by the HP1 chromo domain. *Nature* **410**, 120–124 (2001).
13. Bonasio, R., Tu, S. & Reinberg, D. Molecular signals of epigenetic states. *Science* **330**, 612–6 (2010).
14. Williams, L. M. & Rudensky, A. Y. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol* **8**, 277–284 (2007).
15. Hoyler, T. *et al.* The Transcription Factor GATA-3 Controls Cell Fate and Maintenance of Type 2 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* **37**, 634–648 (2012).
16. Nechanitzky, R. *et al.* Transcription factor EBF1 is essential for the maintenance of B cell identity and prevention of alternative fates in committed cells. *Nature Immunology* **14**:8, 867–875 (2013).
17. Ptashne, M. Principles of a switch. *Nat Chem Biol* **7**, 484–487 (2011).
18. Davis, R. L., Weintraub, H. & Lassar, A. B. Expression of a single transfected cDNA converts fibroblasts to myoblasts. *Cell* **51**, 987–1000 (1987).
19. Yamamoto, M. *et al.* Loss of MyoD and Myf5 in Skeletal Muscle Stem Cells Results in Altered Myogenic Programming and Failed Regeneration. *Stem Cell Reports* **10**, 956–969 (2018).
20. Cramer, P. Organization and regulation of gene transcription. *Nature* **573**:7772, 45–54 (2019).
21. Netea, M. G., Quintin, J. & Van Der Meer, J. W. M. Trained Immunity: A Memory for Innate Host Defense. *Cell Host Microbe* **9**, 355–361 (2011).
22. Marakalala, M. J. *et al.* Dectin-1 plays a redundant role in the immunomodulatory activities of β -glucan-rich ligands in vivo. *Microbes Infect* **15**, 511–515 (2013).
23. D’Urso, A. & Brickner, J. H. Epigenetic transcriptional memory. *Curr Genet* **63**, 435–439 (2017).
24. Gialitakis, M., Arampatzi, P., Makatounakis, T. & Papamatheakis, J. Gamma Interferon-Dependent Transcriptional Memory via Relocalization of a Gene Locus to PML Nuclear Bodies. *Mol Cell Biol* **30**, 2046–2056 (2010).
25. Light, W. H. *et al.* A Conserved Role for Human Nup98 in Altering Chromatin Structure and Promoting Epigenetic Transcriptional Memory. *PLoS Biol* **11**, e1001524 (2013).

26. Kamada, R. *et al.* Interferon stimulation creates chromatin marks and establishes transcriptional memory. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **115**, E9162–E9171 (2018).
27. Siwek, W., Tehrani, S. S. H., Mata, J. F. & Jansen, L. E. T. Activation of Clustered IFN γ Target Genes Drives Cohesin-Controlled Transcriptional Memory. *Mol Cell* **80**, 396–409.e6 (2020).
28. Tehrani, S. S. H. *et al.* STAT1 is required to establish but not maintain IFN γ -induced transcriptional memory. *bioRxiv* 2022.09.17.508285 (2022) doi:10.1101/2022.09.17.508285.
29. D’Urso, A. *et al.* Set1/COMPASS and Mediator are repurposed to promote epigenetic transcriptional memory. *Elife* **5**, (2016).
30. Ngo, C. C. & Man, S. M. Mechanisms and functions of guanylate-binding proteins and related interferon-inducible GTPases: Roles in intracellular lysis of pathogens. *Cell Microbiol* **19**, e12791 (2017).
31. Shenoy, A. R. *et al.* GBP5 Promotes NLRP3 Inflammasome Assembly and Immunity in Mammals. *Science (1979)* **336**, 481–485 (2012).
32. Ibrahim, D. M. & Mundlos, S. The role of 3D chromatin domains in gene regulation: a multi-faceted view on genome organization. *Curr Opin Genet Dev* **61**, 1–8 (2020).
33. Rao, S. S. P. *et al.* Cohesin Loss Eliminates All Loop Domains. *Cell* **171**, 305–320.e24 (2017).
34. Nishimura, K., Fukagawa, T., Takisawa, H., Kakimoto, T. & Kanemaki, M. An auxin-based degron system for the rapid depletion of proteins in nonplant cells. *Nat Methods* **6**, 917–922 (2009).
35. Lämke, J., Brzezinka, K., Altmann, S. & Bäurle, I. A hit-and-run heat shock factor governs sustained histone methylation and transcriptional stress memory. *EMBO J* **35**, 162–175 (2016).
36. Zuo, D. D., Ahammed, G. J. & Guo, D. L. Plant transcriptional memory and associated mechanism of abiotic stress tolerance. *Plant Physiology and Biochemistry* **201**, 107917 (2023).
37. Zacharioudakis, I., Gligoris, T. & Tzamarias, D. A Yeast Catabolic Enzyme Controls Transcriptional Memory. *Current Biology* **17**, 2041–2046 (2007).
38. Plataniias, L. C. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nature Reviews Immunology* 2005 5:5 **5**, 375–386 (2005).
39. Li, X., Leung, S., Qureshi, S., Darnell, J. E. & Stark, G. R. Formation of STAT1-STAT2 Heterodimers and Their Role in the Activation of IRF-1 Gene Transcription by Interferon- α . *Journal of Biological Chemistry* **271**, 5790–5794 (1996).
40. Konermann, S. *et al.* Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex. *Nature* 2014 517:7536 **517**, 583–588 (2014).
41. Skene, P. J. & Henikoff, S. An efficient targeted nuclease strategy for high-resolution mapping of DNA binding sites. *Elife* **6**, (2017).
42. Wen, Z., Zhong, Z. & Darnell, J. E. Maximal activation of transcription by stat1 and stat3 requires both tyrosine and serine phosphorylation. *Cell* **82**, 241–250 (1995).
43. Nabet, B. *et al.* The dTAG system for immediate and target-specific protein degradation. *Nat Chem Biol* **14**, 431–441 (2018).
44. Campos, E. I. & Reinberg, D. Histones: Annotating Chromatin. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.032608.103928> **43**, 559–599 (2009).

45. Deal, R. B., Henikoff, J. G. & Henikoff, S. Genome-wide kinetics of nucleosome turnover determined by metabolic labeling of histones. *Science (1979)* **328**, 1161–1164 (2010).
46. Verzijlbergen, K. F. *et al.* Recombination-induced tag exchange to track old and new proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 64–68 (2010).
47. Keppler, A. *et al.* A general method for the covalent labeling of fusion proteins with small molecules in vivo. *Nature Biotechnology* 2002 *21:1* **21**, 86–89 (2002).
48. Mito, Y., Henikoff, J. G. & Henikoff, S. Genome-scale profiling of histone H3.3 replacement patterns. *Nature Genetics* 2005 *37:10* **37**, 1090–1097 (2005).
49. Santos-Rosa, H. *et al.* Active genes are tri-methylated at K4 of histone H3. *Nature* 2002 *419:6905* **419**, 407–411 (2002).
50. Hu, D. *et al.* The MLL3/MLL4 Branches of the COMPASS Family Function as Major Histone H3K4 Monomethylases at Enhancers. *Mol Cell Biol* **33**, 4745–4754 (2013).
51. Ostuni, R. *et al.* Latent Enhancers Activated by Stimulation in Differentiated Cells. *Cell* **152**, 157–171 (2013).
52. Netea, M. G. *et al.* Defining trained immunity and its role in health and disease. *Nature Reviews Immunology* 2020 *20:6* **20**, 375–388 (2020).
53. Geissmann, F. *et al.* Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science (1979)* **327**, 656–661 (2010).
54. Okabe, Y. & Medzhitov, R. Tissue biology perspective on macrophages. *Nature Immunology* 2016 *17:1* **17**, 9–17 (2015).
55. Wynn, T. A., Chawla, A. & Pollard, J. W. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. *Nature* 2013 *496:7446* **496**, 445–455 (2013).
56. Unanue, E. R. Antigen-Presenting Function of the Macrophage. <https://doi.org/10.1146/annurev.iy.02.040184.002143> **2**, 395–428 (2003).

5. Znacząca działalność naukowa prowadzona w więcej niż jednej instytucji naukowej:

Od początkowych etapów mojej kariery dążę do niezależności naukowej. Podczas studiów magisterskich na Uniwersytecie Warszawskim miałem zaszczyt pracować w laboratorium, które umożliwiło mi realizację własnego projektu badawczego. W tym czasie zafascynowałem się molekularnymi mechanizmami regulacji genów i od tego czasu podążam tą ścieżką. Ponadto odbyłem staż międzynarodowy w cenionym na całym świecie instytucie badawczym, Sainsbury Laboratory w Wielkiej Brytanii.

Aby lepiej poznać mechanizmy regulacji genów, podczas studiów doktoranckich w Międzynarodowym Instytucie Biologii Molekularnej i Komórkowej w Warszawie skupiłem się na biologii strukturalnej interakcji białko-DNA. Opracowałem własny projekt badawczy i

przekonałem do niego mojego promotora. Dodatkowo zdobyłem stypendium naukowe (z Województwa Mazowieckiego) i oraz finansowanie badań, jako kierownik projektu (z Narodowego Centrum Nauki, NCN). Moje wysiłki doprowadziły do odkrycia mechanizmu strukturalnego leżącego u podstaw specyficznego rozpoznawania metylowanego DNA przez białka. Badania opisane zostały w dwóch publikacjach (między innymi), w międzynarodowym, recenzowanym czasopiśmie, w których jestem pierwszym autorem, a dla drugiej pracy także autorem korespondencyjnym (*Siwek et al. Nucleic Acids Research, 2012* i *Mierzejeska, Siwek et al. Nucleic Acids Research, 2014*). W czasie trwania mojego projektu doktorskiego zainicjowałem owocną i długotrwałą współpracę z laboratorium spektrometrii mas w Instytucie Biochemii i Biofizyki PAN, a wyniki tej współpracy stały się częścią opublikowanej pracy (*Mierzejeska, Siwek i in. Nucleic Acids Research, 2014*), a także mojego doktoratu. Napisałem manuskrypty opisujące moje wyniki jak również wspomagałem prace moich młodszych kolegów i koleżanek w laboratorium. Co więcej, w tym czasie ukończyłem również studia podyplomowe z Metod Chemii Analitycznej na Uniwersytecie Warszawskim.

W ramach mojego stażu podoktorskiego, początkowo w Instituto Gulbenkian de Ciência, PT, a następnie na Wydziale Biochemii, Uniwersytetu Oksfordzkiego w Wielkiej Brytanii, oba w laboratorium Larsa Jansena, zdecydowałem się rozszerzyć i skonsolidować moje zainteresowania regulacją genów ponad biologią strukturalną do bardziej fizjologicznego układu modelowego. Zainicjowałem nowatorski temat naukowy skupiający się na regulacji genów w komórkach ssaków, wykraczający poza specjalizacje laboratorium gospodarza. Odkryłem mechanizm, dzięki któremu w komórkach ludzkich powstaje pamięć transkrypcyjna / wrodzona pamięć immunologiczna (*Siwek et al. Molecular Cell, 2020*). W tej pracy jestem pierwszym, ale również autorem korespondencyjnym. W tym czasie, byłem także opiekunem naukowym doktorantki (Sahar Tehrani, „Role of transcriptoin factors in transcriptional memory”). Współpraca z nią zakończyła się publikacją, na której jestem autorem korespondencyjnym (*Tehrani et al. EMBO journal, 2023*). Dodatkowo opracowałem nowatorską metodę pomiaru dynamiki nukleosomów, która zaowocowała publikacją, na której jestem pierwszym autorem (*Siwek et al. Methods in Molecular Biology, 2018*). W ramach stażu podoktorskiego zdobyłem stypendium naukowe oraz, jako współkierownik wraz z moim mentorem, grant badawczy.

Osiągnięcia podczas stażu podoktorskiego, a także narzędzia i metody, które opracowałem w tym czasie, pozwoliły mi zdobyć stypendium Marie Skłodowska-Curie, aby kontynuować prace nad pamięcią transkrypcyjną jako niezależny pracownik naukowy w Massachusetts General Hospital (MGH), Harvard Medical School, USA oraz w

Międzynarodowym Centrum Badań nad Szczepionkami Przeciwnowotworowymi (ICCVS) na Uniwersytecie Gdańskim. Dodatkowo, zdobyłem stanowisko adiunkta w ICCVS wraz z finansowym pakietem startowym na ustanowienie i rozwój laboratorium oraz uzyskałem grant Sonata od Narodowego Centrum Nauki (NCN) na badanie molekularnych mechanizmów pamięci transkrypcyjnej IFN γ .

Podsumowując, w mojej pracy dążę do niezależności, ale i współpracy w celu osiągnięcia znaczących odkryć naukowych. Od początku kariery do obecnych ról jako adiunkt i niezależnego kierownik grantów, podejmowałem inicjatywy, projektowałem prace naukowe, zdobywałem fundusze, mentorowałem innych naukowców i w znacznym stopniu przyczyniłem się do naszego zrozumienia regulacji genów i pamięci transkrypcyjnej.

6. Osiągnięcia dydaktyczne, organizacyjne i popularyzujące naukę:

Wierzę, że obowiązkiem naukowca poza prowadzeniem badań jest promocja nauki w społeczeństwie. Mając to na uwadze już podczas studiów magisterskich, wraz z BioCentrum Edukacji Narodowej (Biocen) współorganizowałem warsztaty szkoleniowe w laboratorium dla uczniów szkół średnich. Inicjatywa ta miała na celu zapewnić uczestnikom bezpośrednie doświadczenie w laboratorium, pobudzając ich ciekawość i entuzjazm dla nauki.

Podczas studiów doktoranckich założyłem naukowy klub dyskusyjny „DoScience”. W ramach klubu zorganizowaliśmy ponad 25 spotkań naukowych otwartych dla publiczności. Na uwagę zasługują dwa duże wydarzenia sponsorowane przez EMBO, w których uczestniczyli nobliści: Venki Ramakrishnan i Brian Kobilka. Oprócz tego byłem współopiekunem studentki studiów magisterskich (Marta Doliwa, “Type III CRISPR complexes from *Thermus thermophilus*”) oraz opiekunem stażysty w laboratorium.

Podczas mojego stażu podoktorskiego byłem członkiem reprezentantów badaczy ze stopniem doktora w Instituto Gulbenkian de Ciência, PT. W ramach komitetu współorganizowałem warsztat recenzji publikacji naukowych sponsorowany przez czasopismo eLife. Ponadto byłem wykładowcą w programie doktorskim Instituto Gulbenkian de Ciência, PT – moduł biologii molekularnej i strukturalnej. Dodatkowo, byłem współopiekunem doktorantki (Sahar Tehrani, „Role of transcriptoin factors in transcriptional memory”) oraz opiekunem stażysty w laboratorium. Poza tym byłem również członkiem komitetu naukowego w konferencji: International Young Scientists Conference on Molecular and Cell Biology w 2020 roku. Jestem również recenzentem ad hoc dla kilku czasopism naukowych, w tym Epigenetics and Cancer Communications.

7. Inne ważne informacje dotyczące kariery zawodowej:

Podczas mojej pracy naukowej zawsze aktywnie staram się zwiększyć swoje umiejętności. W latach 2015-2018 uczestniczyłem w programie szkoleniowym „Gulbenkian Training Program in Bioinformatics”. Ten kompleksowy program obejmował sześć intensywnych kursów, które dostarczyły mi dogłębnej wiedzy na temat różnych aspektów analizy danych bioinformatycznych. Ponadto, podczas mojego pobytu w Stanach Zjednoczonych, odbyłem dziewięciomiesięczny kurs „Leadership in Research”, prowadzony przez Uniwersytet Harvarda. To intensywne szkolenie było kluczowym krokiem w doskonaleniu moich umiejętności w zakresie zarządzania laboratorium i wyposażeniu mnie w niezbędne narzędzia do stworzenia i prowadzenia grupy badawczej na Uniwersytecie Gdańskim.

Oświadczam, że nie ubiegałem się wcześniej o stopień habilitacji.

.....
(podpis wnioskodawcy)