

Autoreferat

dr Jakub Mieczkowski

Międzynarodowa Agenda Badawcza
Laboratorium Medycyny 3P
Gdański Uniwersytet Medyczny

Maj 2020 r.

1. Imię i Nazwisko

Jakub Mieczkowski

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

2003 - 2008 r. - studia na wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego;

2008 r. - tytuł **magistra matematyki** ze specjalizacją w statystyce stosowanej;

Tytuł pracy magisterskiej:

„Maksymalizacja korelacji wyników mikromacierzowych z wynikami qRT–PCR”

2008 - 2013 r. - studia doktoranckie w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN;

2013 r. - tytuł **doktora nauk biologicznych** (cum laude) ze specjalizacją w bioinformatyce;

Tytuł pracy doktorskiej:

„Optymalizacja i opracowanie nowej metody analizy szlaków sygnałowych związanych z patogenezą nowotworów mózgu w oparciu o profilowanie ekspresji genów”.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

03.2016 - 05.2016 r. - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Post-doc

06.2013 - 06.2016 r. - Harvard Medical School/Massachusetts General Hospital,
Research Fellow in Genetics

08.2016 - 08.2019 r. - Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN,
Senior post-doc – Kierownik podgrupy w ramach Pracowni Neurobiologii Molekularnej

12.2019 r. - obecnie - Międzynarodowa Agenda Badawcza; Laboratorium Medycyny
Badawczej 3P w Gdańskim Uniwersytecie Medycznym,
Adiunkt, Kierownik Grupy Biologii Obliczeniowej

4. Omówienie osiągnięć, o których mowa w art. 219 1 pkt 2 Ustawy

- **Tytuł osiągnięcia naukowego**

Opracowanie metody rozróżnienia aktywnej i dostępnej chromatyny oraz identyfikacji zmian w strukturze chromatyny wywołanych czynnikami zewnątrzkomórkowymi.

- **Publikacje składające się na osiągnięcie naukowe**

Mieczkowski, J.*, Cook, A.*, Bowman, SK.*, Mueller, B., Alver, BH., Kundu, S., Deaton, AM., Urban, JA., Larschan, E., Park, P.J., Kingston RE., Tolstorukov, MY., MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility. Nat. Commun., 7:11485, 2016. *pierwsi autorzy
IF: 12.124; MNiSW: 45 (zgodnie z rokiem opublikowania)
Liczba cytowań WoS: 67

Mueller, B.*, **Mieczkowski, J.***, Kundu, S., Wang, P., Sadreyev, R., Tolstorukov, MY., Kingston, RE., Widespread changes in nucleosome accessibility without changes in nucleosome occupancy during a rapid transcriptional induction, Genes & Dev., 31(5):451, 2017. *pierwsi autorzy
IF: 9.462; MNiSW: 45 (zgodnie z rokiem opublikowania)
Liczba cytowań WoS: 31;

Cook, A.*, **Mieczkowski, J.***, Tolstorukov, MY, Single-Assay Profiling of Nucleosome Occupancy and Chromatin Accessibility, Current Protocols in Molecular Biology., Oct 2:120:21.34-21.34.18, 2017. *pierwsi autorzy
IF: ---; MNiSW: --- (zgodnie z rokiem opublikowania)
Liczba cytowań WoS: ---;

Całkowity Impact factor powyższych prac: 21.586

Całkowita punktacja MNiSW powyższych prac: 90

Oświadczenia współautorów o indywidualnym wkładzie autorskim – załącznik nr 5.

- **Omówienie celu naukowego wyżej wymienionych prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania**

W latach 2013-2016 jako pracownik naukowy uniwersytetu Harvarda uczestniczyłem w kilku projektach dotyczących czynników epigenetycznych wpływających na ekspresję genów poprzez zmianę stanu chromatyny w komórkach zdrowych oraz komórkach nowotworowych¹⁻⁵. W szczególności, byłem głównym biologiem obliczeniowym w zespole, który opracował nową metodę oceny dostępności chromatyny, a także różnic pomiędzy jej dostępnością i aktywnością. Uzyskane wyniki pokazały, że obecność nukleosomów nie wyklucza dostępności do łańcucha DNA ujawniając nowe zasady regulacji ekspresji genów. Zidentyfikowana regulacja ma miejsce między innymi poprzez aktywację adaptacyjnej odpowiedzi na stres (*ang. Unfolded Protein Response*), zachodzącej w chorobach neurodegeneracyjnych, takich jak choroba Parkinsona czy choroba Alzheimera. Poza potencjalną wartością kliniczną, uzyskane wyniki stanowią przełamanie jednego z dogmatów biologii molekularnej, który mówił, że do aktywacji chromatyny dochodzi poprzez usunięcie nukleosomów. Główne prace opisujące przytoczone wyniki stanowią przedstawione osiągnięcie naukowe.

Wstęp

Epigenetyka jest stosunkowo nową dziedziną nauki, która nie ma jeszcze ściśle określonej definicji. Jest to nauka o procesach zachodzących w jądrze komórkowym, które nie są związane z sekwencją nukleotydów w łańcuchy DNA. Takimi procesami są na przykład rozmieszczanie łańcucha DNA w jądrze komórkowym, trójwymiarowe formowanie łańcucha DNA czy powiązana z tą strukturą regulacja ekspresji genów.

O ekspresji genów w danej komórce decyduje wiązanie się do DNA kombinacji aktywnych czynników transkrypcyjnych, które aktywują odpowiednie geny poprzez wiązanie się z DNA we fragmentach regulatorowych. W znakomitej większości regulatorowe fragmenty DNA to poza genowe, tzn. niekodujące białka, fragmenty DNA. Możliwość wiązania się czynników transkrypcyjnych do DNA jest związana z dostępem do wybranego fragmentu DNA. Ten z kolei, jest warunkowany przez trójwymiarową topologię łańcucha DNA wraz z już przyłączonymi do niego białkami, co określane jest jako struktura chromatyny.

Zmiany środowiskowe wpływają na ekspresję genów w komórkach eukariotycznych, między innymi poprzez zmianę struktury chromatyny. Pozwalają one uaktywnionym czynnikom transkrypcyjnym aktywować wcześniej nieaktywne szlaki sygnałowe i procesy wewnątrzkomórkowe. Ponieważ struktura chromatyny określa które geny mogą być aktywowane, jej profil może pomóc w zrozumieniu i monitorowaniu procesów komórkowych, takich jak na przykład onkogeneza czy choroby neurodegeneracyjne. Wyniki uzyskane w ostatnich latach uwypukliły znaczenie zmian w strukturze chromatyny i wykazały ich znaczenie w kontekście regulacji transkrypcji, w tym w procesach chorobotwórczych oraz w odpowiedzi na terapię⁶⁻¹⁰. Dlatego ważne jest precyzyjne określenie zmian zachodzących w chromatynie.

Budowa chromatyny

Podstawową jednostką strukturalną chromatyny w organizmach eukariotycznych jest nukleosom składający się z białek histonowych i łańcucha DNA^{11,12}. Zawiera on łańcuch DNA o długości 147 par zasad, który jest owinięty wokół oktameru białek histonowych,

składającego się z dwóch kopii każdego z histonów H2A, H2B, H3 i H4. Poza upakowaniem DNA, nukleosomy odgrywają również ważną rolę w kontrolowaniu dostępności do DNA, wpływając tym samym na procesy komórkowe, takie jak transkrypcja, replikacja i naprawa DNA^{11,13,14}.

Zwarte formowanie się nukleosomów może ograniczać działanie wielu czynników regulatorowych specyficznie wiążących się do sekwencji DNA, jak i ogólnych składników maszynierii transkrypcyjnej¹⁵. Dostępność chromatyny, którą można zmierzyć poprzez ilościowe określenie ochrony DNA przed trawieniem enzymatycznym odgrywa zasadniczą rolę w regulacji ekspresji genów¹. Dostępność DNA w chromatynie jest często kontrolowana przez obecność nukleosomów¹⁶⁻¹⁸. Właściwości fizyczne nukleosomów różnią się w obrębie całego genomu. Istnieje kilka rodzin kompleksów przebudowy nukleosomów zależnych od adenozyno-5'-trifosforanu (ATP), które mogą zmieniać ich stabilność, budowę i skład¹⁹.

Jednymi z mechanizmów zmiany struktury chromatyny są kowalencyjne modyfikacje histonu oraz zastosowanie "wariantów" histonu, które zmieniają właściwości zbudowanych z nich nukleosomów. Mogą one wpływać na stabilność oktameru i zdolność do tworzenia struktur chromatyny wyższego rzędu, tzn. wpływania na trójwymiarową topologię łańcucha DNA^{1,20-24}. Nieprawidłowa struktura chromatyny może zaburzać fizjologiczne funkcjonowanie komórek, na przykład prowadzić do powstania nowotworu. Mimo że uważa się, że nowotwór jest chorobą genomu, są już dobrze udokumentowane zaburzenia w dostępności chromatyny które wspomagają, a nawet powodują procesy nowotworowe²⁵⁻²⁷. Dodatkowo, korzystna struktura chromatyny może ułatwić leczenie farmakologiczne²⁸⁻³⁰. W związku z tym, zrozumienie procesów prowadzących do zmian w dostępności chromatyny może przyczynić się do poprawy wyników istniejących terapii, opracowania terapii wspomagających już istniejące, a także powstania nowych metod leczenia.

Badania obejmujące cały genom wykazały, że nukleosomy nie są rozmieszczone losowo wzdłuż genomu, ale są relatywnie częste w niektórych pozycjach, podczas gdy w innych występują stosunkowo rzadko^{13,31-33}. Pozycje nukleosomów w obrębie regionów genomowych odgrywają ważną rolę w kształtowaniu środowiska komórkowego, które albo pozwala na transkrypcję, albo jej zapobiega. Również zmiany dotyczące charakteru, a nie tylko pozycji nukleosomów, wpływają na transkrypcję genów. Kowalencyjne modyfikacje post-translacyjne N-końcówkowych ogonów histonowych są związane z upakowaniem (heterochromatyna) bądź rozluźnieniem chromatyny. Może być to związane z odpowiednio ograniczoną, w przypadku heterochromatyny, bądź aktywną w przypadku euchromatyny, transkrypcją genów. Włączenie szczególnych wariantów podstawowych białek histonowych, takich jak histon H3.3., który jest wariantem histonu H3 czy H2A.Z, będącego wariantem histonu H2A, wpływa na stabilność chromatyny. Podsumowując, wiele poziomów kontroli epigenetycznej stanowi o odpowiedniej regulacji ekspresji genów w zdrowych komórkach oraz o alternatywnej regulacji ekspresji genów w komórkach patologicznych^{7,34}.

Struktura chromatyny reguluje procesy komórkowe

Rola zmian struktury chromatyny w oporności na terapię nie jest w pełni zbadana, ale wykazano, że terapie epigenetyczne są skutecznym wsparciem dla innych rodzajów terapii, na przykład przeciwnowotworowej. Znane są inhibitory metylotransferaz DNA i inhibitory deacetylaz histonowych, które regulują niektóre immunologiczne składniki sygnalizacyjne w komórkach rakowych³⁵. Także inne badania przedkliniczne sugerowały,

że modulatory epigenetyczne, działające za pośrednictwem kilku mechanizmów sygnalizacyjnych obejmujących zarówno komórki nowotworowe, jak i komórki immunologiczne gospodarza, mogą wzmocnić terapię immunologiczną^{36,37}. Ogólnie rzecz biorąc, wspomagające leczenie epigenetyczne może być kluczowe dla skuteczności terapii, poprzez ułatwienie działania terapii celujących w procesy komórkowe. Dlatego też dogłębna charakterystyka zmian dostępności chromatyny wynikających z leczenia epigenetycznego może być kluczowa dla wyboru optymalnej terapii.

Badania przedkliniczne wykazały, że nowotwory są wrażliwe na różne inhibitory enzymów związanych z procesami epigenetycznymi. Niektóre z tych inhibitorów zostały już zatwierdzone do stosowania u pacjentów przez amerykański Urząd ds. Żywności i Leków (ang. *US Food and Drug Administration*)³⁴. Kwas walproinowy, inhibitor deacetylazy histonów i jednocześnie lek przeciwpadaczkowy, hamuje także proliferację komórek glejaka³⁸. W przypadku pacjentów z rozsiałym glejakiem samoistnym (ang. *Diffuse intrinsic pontine gliomas*), u których bardzo często występuje mutacja H3.3K27M, wykazano, że inhibitor demetylazy H3K27me3 (ang. *Lysine demethylase 6B, JMJD3/KDM6B*) jest skuteczny w zmniejszaniu wzrostu guza³⁹. W komórkach glejaka wielopostaciowego (ang. *glioblastoma, GBM*), w których również wykazano atypowe profile H3K27me3, wykazano, że wysoce specyficzny inhibitor EZH2 (ang. *Enhancer of Zeste 2 Polycomb Repressive complex 2 subunit*), kluczowego elementu regulatora epigenetycznego ssaków (ang. *polycomb repressive complex 2, PRC2*), ogranicza wzrost guza^{40,41}. Wykazano także, że inhibitor demetylazy histonowej LSD1/KDMA1 (ang. *Lysine Demethylase 1A*) indukuje apoptozę komórek glejaka⁴². Ponadto w modelach *in-vitro* łączne zastosowanie kwasu walproinowego i inhibitora LSD1/KDMA1 powoduje śmierć komórek glejaka, ale nie ich niepatologicznych odpowiedników⁴³. Inhibitory białek rozpoznających acetylację histonów (ang. *readers*) okazały się skuteczne w niektórych typach rdzeniaka (ang. *medulloblastoma*)^{44,45}. Wszystkie te badania dostarczyły dowodów na to, że skład epigenetyczny może być modulowany przy użyciu inhibitorów małych cząsteczek, i że taka modulacja może wpływać na leczenie nowotworów. Tak więc zarówno pozycje nukleosomów, jak i ich charakter są złożonymi regulatorami dostępności łańcucha DNA. Właściwości fizyczne nukleosomów oraz ich położenie determinuje dostępność do chromatyny, co ma ogromne znaczenie dla zrozumienia mechanizmów epigenetycznych w komórkach.

Metody analizy struktury chromatyny

Dostępnych jest kilka metod do pomiaru dostępności chromatyny w skali całego genomu. Metody te wykorzystują albo enzymy restrykcyjne (np. nukleaza mikrokokalna - MNase, DNase), albo zaburzenia fizyczne (np. FAIRE, Sono-seq)⁴⁶⁻⁴⁹ do fragmentowania DNA, a następnie sekwencjonowania uzyskanych fragmentów. Inne metody wykorzystują metylację DNA (MeDIP footprinting, NOME-seq)^{50,51} lub transpozycję Tn5 (ATAC-seq)⁵², która jednocześnie wycina i oznacza fragmenty chromatyny. Każda z tych metod dostarcza użytecznych informacji i ma unikatowe zalety. Jednak niedoskonałości tych metod wynikają z faktu, że próbują one opisać niejednorodną strukturę chromatyny przy użyciu tylko jednego pomiaru (tj. jednego wygenerowanego profilu). W rezultacie, niektóre metody, takie jak ATAC-seq i DNase-seq, pozwalają głównie uzyskać profil dla fragmentów otwartej chromatyny⁵². Istnieją też metody, które umożliwiają badania całego genomu dzięki temu, że wykorzystują do trawienia chromatyny relatywnie mały enzym mikrokokalny (MNaza)⁴⁸. Enzym ten, przecina łańcuch DNA w rejonach, które nie są zajęte przez białka związane z DNA i pozwala na otrzymanie wyników także z mocno

upakowanej chromatyny. Niestety metody wykorzystujące ten enzym często są bardzo wrażliwe na nawet niewielkie zmiany w warunkach doświadczalnych (takich jak stężenie enzymu) co komplikuje porównanie struktury chromatyny w różnych warunkach i typach komórek⁵³⁻⁵⁶.

Przedstawiona sytuacja oznaczała zapotrzebowanie na nową metodę analizy dostępności chromatyny, która pozwoliłaby w sposób mierzalny i cało-genomowy charakteryzować zarówno otwartą, jak i zamkniętą chromatynę. Zespół, którego byłem członkiem na Uniwersytecie Harvarda opracował taką metodę analizy. Przedstawienie tej innowacyjnej metody, umożliwiające dzięki niej odkrycie zmieniające fundamentalne podejście do regulacji odpowiedzi komórki na czynniki zewnętrzne oraz protokół umożliwiający przeprowadzenie analizy stanowią przedstawione dzieło.

Cel naukowy

Moim celem naukowym było opracowanie nowej metody analizy dostępności chromatyny. Chciałem, aby opracowana metoda spełniała cztery podstawowe założenia. **Po pierwsze**, miała umożliwić rozróżnienie nukleosomów różnego typu. Miała pozwolić na profilowanie zarówno dostępnych, jak i mocno upakowanych nukleosomów. **Po drugie**, miała to być metoda cało-genomowa, pozwalająca w jednakowych warunkach uzyskać profil dostępności całego genomu. **Po trzecie**, miała umożliwić wewnętrzną normalizację, tzn. umożliwić porównywanie profili dostępności chromatyny pomiędzy różnymi próbkami bez odnoszenia pojedynczego profilu do całej analizowanej grupy. Miało to umożliwić porównywanie profili uzyskanych dla różnych próbek, a nawet dla różnych organizmów, co ułatwi prace z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. **Po czwarte**, miała to być metoda ilościowa. Miała w sposób mierzalny pozwolić na analizę dostępności chromatyny i umożliwić porównanie stopnia dostępności za pomocą ciągłej skali liczbowej.

Opis wyników uzyskanych w poszczególnych pracach

Praca numer 1

Mieczkowski J*, Cook A*, Bowman SK*, Mueller B, Alver BH, Kundu S, Deaton AM, Urban JA, Larschan E, Park PJ, Kingston RE, Tolstorukov MY, MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility, *Nat Commun.* 2016 May 6; 7:11485.

*pierwsi autorzy

Najważniejsze wyniki zaprezentowane w omawianej pracy to opracowanie nowej metody analizy chromatyny, która w sposób mierzalny pozwala ocenić dostępność zarówno euchromatyny (luźno upakowanej chromatyny), jak i heterochromatyny (mocno upakowanej chromatyny) oraz wykazanie, że dostępna chromatyna nie musi być wolna od nukleosomów.

Wprowadzenie

Z punktu widzenia regulacji ekspresji genów dostępność DNA jest krytyczną cechą dla czynników regulacyjnych i maszynierii transkrypcyjnej^{15,17,57}. Dostępność każdego fragmentu DNA jest podyktowana organizacją chromatyny, a więc dynamicznymi interakcjami łańcucha DNA z białkami i RNA. Właśnie dynamiczny i złożony charakter organizacji chromatyny sprawia, że pomiar dostępności DNA jest trudnym zadaniem^{32,58}.

Dominujące metody mapowania położenia nukleosomów opierają się na trawieniu nukleazami, najczęściej z mikrokokalną nukleazą (*ang. micrococcal nuclease* MNase). Jednakże badania wykonywane przy pomocy trawienia są podatne na problemy techniczne, które mogą utrudniać interpretację i porównanie próbek z wynikami^{32,58}. Przecięcia za pomocą MNazy nie występują losowo, ponieważ wykazuje ona preferencje sekwencyjne. Dodatkowo wyniki trawienia za pomocą MNazy są wrażliwe na nawet niewielkie zmiany w aktywności enzymów⁵⁴⁻⁵⁶. Może to powodować wyraźne różnice w pozycjonowaniu nukleosomów, które nie są zależne od regulacji biologicznej, ale od technicznych różnic w trakcie wykonywania eksperymentu^{59,60}. Z tego względu zostały zaproponowane różne eksperymentalne i obliczeniowe podejścia, które miały zmniejszyć techniczną zmienność i wprowadzić standaryzację. Podejścia te próbują "znormalizować" mapy pozycjonowania nukleosomów poprzez optymalizację warunków trawienia, normalizację generowanych danych lub wykorzystanie różnych buforów do fragmentacji chromatyny^{53,61-64}.

Pomiar dostępności chromatyny i określenie związku pomiędzy dostępnością a zdolnością białek regulacyjnych i RNA do dostępu do DNA to kluczowe pytania w biologii genomu. Identyfikacja lokalizacji nukleosomów jest jednym z głównych czynników kontrolujących dostępność chromatyny. Jednakże badania w tym zakresie prowadzone w komórkach eukariotycznych (np. w *Drosophila* i ssaków) były utrudnione ze względu na charakterystykę nukleazy mikrokokalnej (MNase), enzymu zwykle stosowanego w celach analizy pozycjonowania nukleosomów.

Wraz z moimi kolegami eksperymentalistami z Uniwersytetu Harvarda opracowałem nową metodę analizy dostępności chromatyny, którą nazwaliśmy MACC (*ang. MNase accessibility*). Nasza metoda opiera się na analizie zmienności pojawiającej się w profilach chromatyny uzyskanych przy pomocy różnych stężeń MNase. Oznacza to, że wykorzystuje ona największą wadę testów przeprowadzanych z zastosowaniem MNase,

tzn. zmienność wynikającą z innych warunków trawienia, i zmienia ją w kluczowy element analizy dostępności chromatyny.

Założenia autorskiej metody analizy dostępności chromatyny

Metoda stanowiąca podstawę tej publikacji nie tylko stanowi rozwiązanie problemów z opisywaną zmiennością profili chromatyny, ale przede wszystkim, wykorzystuje tę zmienność do oszacowania nowej charakterystyki nukleosomów. W szczególności: (i) podejście to wykorzystuje dynamiczną reakcję chromatyny na enzym trawienny i nie jest ograniczone do statycznego odczytu. Opracowana przez mnie metoda jest zatem innowacyjna w stosunku do innych metod stosowanych obecnie do profilowania dostępności chromatyny; (ii) w przeciwieństwie do innych stosowanych metod, prezentowane podejście pozwala na ilościowy pomiar zarówno wysokiej (otwartej), jak i niskiej (zamkniętej) dostępności. Jest to zrealizowane przy pomocy niespotykanej wcześniej ocenie w skali ciągłej, która zapewnia pomiar metryczny dla każdego nukleosomu w genomie; oraz (iii) pozwala ono zarówno na pozycjonowanie nukleosomu, jak i pomiar dostępności chromatyny w tym samym badaniu.

Opisana w tej pracy metoda jest stosunkowo łatwa do zastosowania w organizmach o różnej złożoności, w tym u ssaków. Przedstawiona metodologia może uchwycić zarówno rozkład dużych domen struktury chromatyny w dużej skali (>1000 par zasad), jak i lokalne wzorce interakcji pomiędzy nukleosomami i białkami innymi niż histony w skali setek par zasad. Opracowana metryka może więc opisać strukturę chromatyny w niespotykany dotąd sposób, ujawniając nowe cechy organizacji chromatyny, które są związane z regulacją genów.

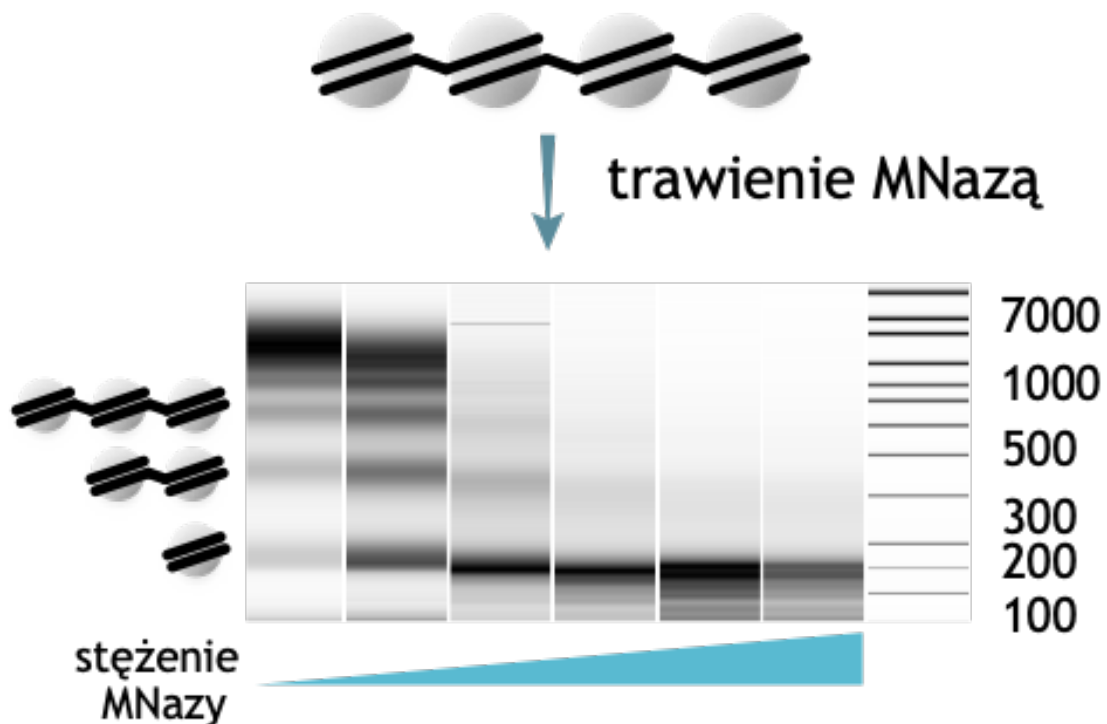
Wykorzystane modele komórkowe

Aby wykorzystać zmienność wynikającą z warunków trawienia, analizowane próbki były trawione przy użyciu nukleazy mikrokokalnej w czterech różnych stężeniach. Pozwoliło to na uzyskanie kompleksowej, cało-genomowej mapy dostępności chromatyny. W tej pracy wszystkie eksperymenty i analizy zostały przeprowadzone przy pomocy linii komórkowej S2 wyprowadzonej z komórek muszki owocowej (*Drosophila melanogaster*). Dodatkowo najważniejsze wyniki zostały potwierdzone w mysim modelu różnicowania komórek nerwowych oraz w modelu białaczki, ustalonej linii komórkowej K562. Zastosowanie muszkiego modelu pozwoliło wzbogacić analizy o szeroką gamę publicznie dostępnych profili białek modyfikujących chromatynę i fizycznych właściwości chromatyny uzyskanych w ramach projektu modENCODE⁶⁵. Wykorzystanie zarówno modelu muszkiego jak i komórek ssaczych pozwoliło na obserwację wpływu metylacji DNA na charakterystykę dostępu chromatyny.

Charakterystyka zastosowanej metody

W opisanych w tej pracy badaniach zastosowane stężenia enzymu mikrokolanego zależały od typu analizowanych komórek. Dla komórek muszycznych w 500 μ l roztworze stosowaliśmy następujące ilości jednostek: 1,5, 6,25, 25 i 100 U. W przypadku komórek mysich i ludzkich na 500 μ l roztwór przypadało odpowiednio 1, 4, 16, 64 U oraz 5.4, 20.6, 79.2 i 304 U. Różne stężenia wynikają z różnego upakowania chromatyny i powinny być wybierane indywidualnie do każdego eksperymentu. Istotne by kolejne wartości stężeń po transformacji logarytmem dwójkowym przedstawiały w przybliżeniu szereg arytmetyczny (np. $\log_2(1,5) = 0.58$, $\log_2(6,25) = 2.64$, $\log_2(25) = 4.64$ i $\log_2(100) = 6.64$) oraz by w wyniku trawień uzyskać odpowiednio zróżnicowane długości fragmentów DNA. Najniższe

stężenie powinno pozwolić na uzyskanie małej liczby fragmentów mononukleosomowego DNA, a w wyniku trawienia z największym wybranym stężeniem fragmenty mononukleosomowego DNA powinny stanowić zdecydowaną większość otrzymanych



Rysunek 1 Wynik elektroforezy kapilarnej przedstawiający wyniki trawienia za pomocą różnych trawień MNazy. Oś pionowa określa wilkość fragmentów DNA uzyskanych po trawieniu (najdłuższe na górze, najniższe na dole). Oś pozioma wskazuje stężenia MNazy wykorzystane do trawień (najmniejsze po lewej stronie, największe po prawej). Po lewej stronie zaznaczone zostały wysokości odpowiadające odpowiednio tri-, di- i mono- nukleosomalnym fragmentom.

fragmentów (Rys. 1).

Otrzymane fragmenty zostały zsekwencjonowane za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (*ang. next generation sequencing*). Liczba zsekwencjonowanych fragmentów potrzebna do uzyskania wiarygodnego profilu zależy od wielkości genomu oraz rozdzielczości z jaką chce się przeprowadzać analizę. Rozdzielczość rozumiana jest przez, wyrażoną w liczbie par zasad, długość fragmentów łańcucha DNA, dla których obliczana będzie wartość MACC i która jest istotą z punktu widzenia analizy i możliwości wyciągania wniosków. Długie fragmenty pozwolą na obniżenie kosztów analizy, ale uniemożliwią wnioskowanie o pojedynczych nukleosomach. Dla genomu muszego (*dm3*) i rozdzielczości 150 par zasad 25 milionów poprawnie zmapowanych do sekwencji genomu referencyjnego (*ang. alignment*) odczytów przypadających na jedno stężenie jest liczbą wystarczającą.

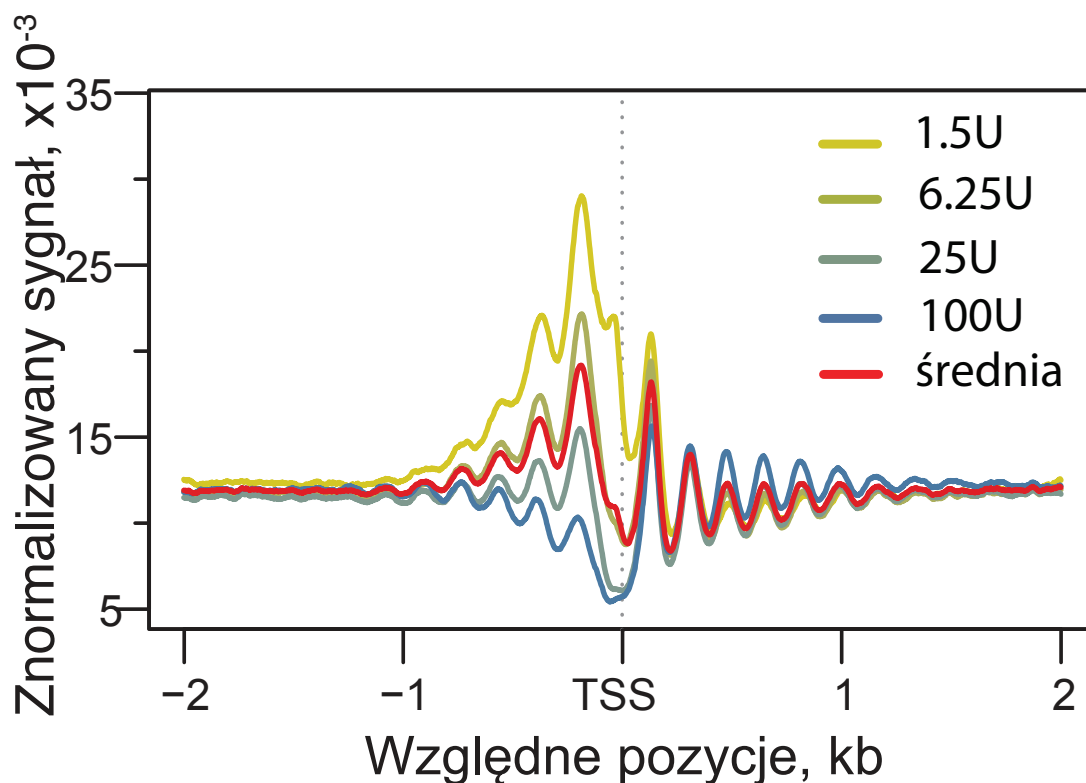
Metoda obliczania parametru MACC

Współczynnik MACC wyliczany jest dla fragmentu łańcucha DNA poprzez porównanie liczby otrzymanych sekwencji z poszczególnych trawień, każdorazowo znormalizowanych do wielkości biblioteki. Obliczanie współczynnika przebiega następująco: **(1)** łańcuch DNA zostaje podzielony na nieprzecinające się przedziały o równej wielkości nazwanej rozdzielczością; **(2)** dla każdego z przedziałów zostaje zliczona liczba fragmentów

otrzymanych po każdym z trawień z osobna; **(3)** otrzymane liczby zostają znormalizowane do wielkości zsekwencjonowanych bibliotek, a w przypadku porównań pomiędzy różnymi organizmami także do wielkości genomu; **(4)** znormalizowane wartości oraz wartości wykorzystanych stężeń są następnie użyte do przeprowadzenia regresji liniowej dla każdego przedziału z osobna; **(5)** otrzymane z regresji liniowych współczynniki kierunkowe są normalizowane ze względu na częstość nukleotydów GC w każdym z przedziałów; **(6)** tak znormalizowane współczynniki kierunkowe regresji liniowej nazwane zostały współczynnikami MACC, i wykorzystywane są jako miary dostępności chromatyny.

Jednoczesna analiza dostępności chromatyny i obłożenia nukleosomów

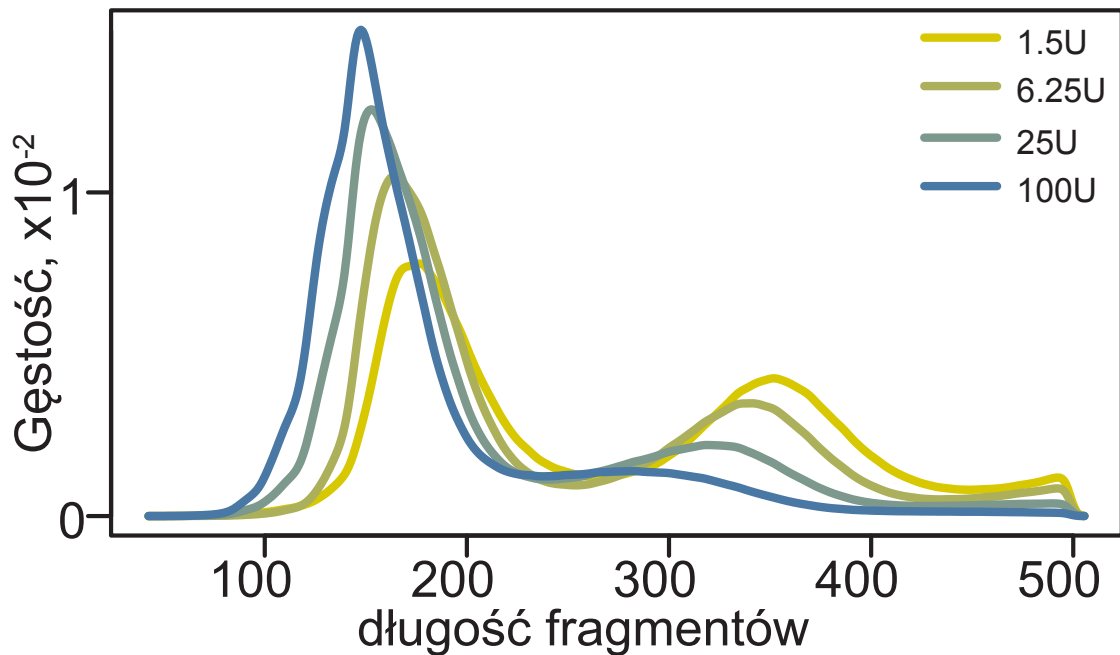
Istotne jest, że wyniki uzyskane za pomocą pojedynczego stężenia są zwykle wykorzystywane jako miara obłożenia nukleosomów, rozumianego jako uśredniona obecność nukleosomów w puli analizowanych komórek. Jednak jak pokazały nasze wyniki (Rys. 2), taka metoda jest bardzo czuła na zmiany warunków, w tym na wybrane stężenia



Rysunek 2 Obłożenie nukleosomów wokół startu transkrypcji aktywnych genów. Skala barwna koresponduje ze stężeniem MNazy wykorzystanym do trawienia. Czerwona linia reprezentuje uśredniony profil.

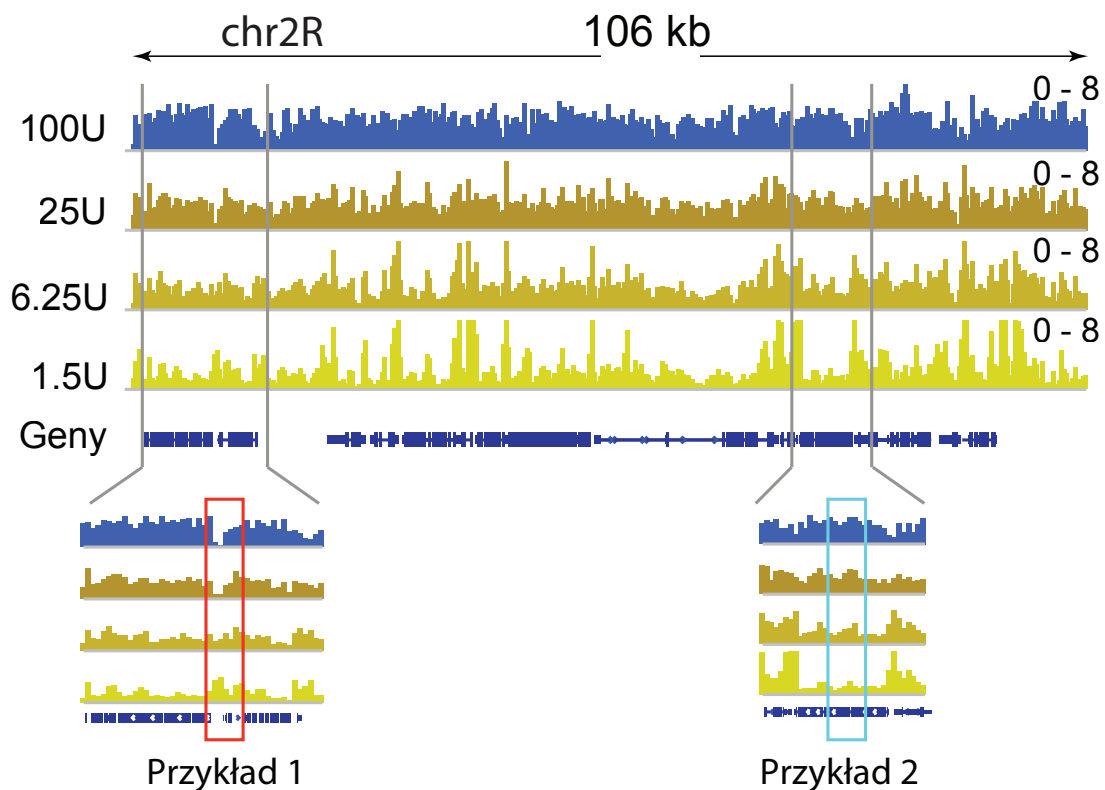
nukleazy mikrokokalnej. Przynajmniej częściowo może to tłumaczyć brak zgodności wyników uzyskanych przez różne laboratoria^{59,60}. Zauważyliśmy, że stężenia enzymu wykorzystywane do trawienia, przy zachowaniu innych czynników, determinują upakowanie chromatyny z którego uzyskane będą odczyty. Stosując małe stężenie, uzyskujemy głównie fragmenty z euchromatyny, tzn. luźno upakowanej chromatyny, ponieważ przy niskim stężeniu enzymowi nie uda się trawić upakowanego DNA. Z kolei stosując duże stężenia uzyskujemy głównie fragmenty pochodzące z heterochromatyny, tzn. mocno upakowanego łańcucha DNA. Dzieje się tak, ponieważ fragmenty pochodzące

z euchromatyny są zbyt krótkie by można je było zsekwencjonować przy użyciu sekwenatorów nowej generacji (Rys. 3).



Rysunek 3 Rozkład długości zsekwencjonowanych fragmentów po trawieniu wybranymi stężeniami MNazy.

W związku z tym, zamiast na obłożeniu nukleosomów, postanowiliśmy badać obserwowaną zmienność, której obserwowanie umożliwiło stosowanie różnych stężeń enzymu mikrokokalnego (Rys. 4). Warto dodać, że tak zaproponowane podejście pozwala



Rysunek 4 Wizualizacja częstości otrzymanych fragmentów w zależności od wybranych stężeń MNazy.

jednocześnie mierzyć opisaną zmienność oraz po zsumowaniu uzyskanych wyników, obłożenie nukleosomów. Jest to równoważne z metodą polegającą na łącznym sekwencjonowaniu wyników uzyskanych z różnych stężeń.

Zastosowane przez nas podejście, pozwala także na wzbogacenie analizowanych fragmentów we fragmenty, do których przyczepione jest wybrane białko, lub z którym związana jest konkretna modyfikacja. W omawianej pracy przedstawiliśmy użyteczność współczynnika dostępności obliczonego dla całej chromatyny (*ang. chromatin MACC*, c-MACC) oraz obliczonego dla puli fragmentów wzbogaconej we fragmenty związane z białkiem histonowym (*ang. histone MACC*, h-MACC). Wzbogacenie zostało uzyskane przy pomocy immunoprecypitacji chromatyny. Przeprowadzona przeze mnie analiza bioinformatyczna pokazała, że c-MACC i h-MACC dają podobne wyniki w odniesieniu do większości genomu. Jednak analiza miejsc regulatorowych, w tym uwzględnienie miejsc wiązania białek regulatorowych oraz części kodujących wykazała istotne różnice pomiędzy wartościami c-MACC i h-MACC. Wykazałem, że c-MACC może być pomocny w analizie regulacji ekspresji, podczas gdy h-MACC może pomóc w analizie fizycznych właściwości chromatyny.

Podsumowanie

Charakterystyka chromatyny wykonana za pomocą metody MACC może mieć szeroki zakres zastosowań w badaniach dotyczących mechanizmów regulacji ekspresji genów oraz modelowania struktury chromatyny. Na przykład MACC pozwala wykrywać i rozróżniać zmiany w strukturze chromatyny obejmujące różne sposoby wiązania białek do łańcucha DNA, które wynikają z wiązania pionierskich czynników transkrypcyjnych (*ang. pioneering transcription factors*) do nukleosomalnego DNA podczas inicjowania zmian kierunku różnicowania komórek. MACC jest stabilną i relatywnie prostą metryką, która może być stosowana z immunoprecypitacją histonową lub bez niej w celu scharakteryzowania genomu na sposoby niedostępne dla poprzednich metod.

Praca numer 2

Mueller B*, Mieczkowski J*, Kundu S, Wang P, Sadreyev R, Tolstorukov MY, Kingston RE, Widespread changes in nucleosome accessibility without changes in nucleosome occupancy during a rapid transcriptional induction, *Genes Dev.* 2017 Mar 29. *Genes Dev.* 2017 Mar 29. 31(5):451, 2017

*pierwsi autorzy

Najważniejszymi wynikami zaprezentowanymi w drugiej przedstawionej pracy jest wykrycie nowego mechanizmu aktywacji ekspresji genów wynikającego z odpowiedzi na czynnik stresowy oraz wykazanie, że cało-genomowe zmiany w dostępności nukleosomów mogą dominować nad zmianami w obłożeniu nukleosomów w trakcie odpowiedzi na czynniki zewnętrzne.

Wprowadzenie

W przeszłości postulowano, że zarówno wiele czynników regulatorowych, jak i elementy ogólnej maszynery transkrypcyjnej wiążące się ze specyficzną sekwencją DNA są hamowane poprzez obecność nukleosomów¹⁵. Wiodąca teoria głosiła, że podczas aktywacji transkrypcji genów, jądra nukleosomów mają przesuwac się wzdłuż DNA w celu swobodnej regulacji, bądź mają być usuwane przez przeniesienie histonów do białek opiekuńczych (*ang. chaperone*) lub do innych regionów DNA^{19,66,67}. Identyfikacja regionów rzekomo wolnych od nukleosomów w miejscach rozpoczęcia startu transkrypcji (*ang. transcription start site, TSS*) oraz w sekwencjach wzmacniających transkrypcję (*ang. enhancers*) doprowadziła do hipotezy, że usunięcie jąder nukleosomów z miejsc regulatorowych może być kluczowym mechanizmem aktywacji ekspresji genów^{68,69}. Alternatywne mechanizmy aktywacji ekspresji obejmują: zmianę dostępności DNA na powierzchni nukleosomu przez ATP-zależne białka re-modelujące chromatynę, włączenie do nukleosomów niektórych wariantów histonów, lub destabilizację nukleosomu poprzez acetylowanie ogonów histonów. Te ostatnie modele uzyskały wsparcie w ramach niedawno opublikowanych badań. Wskazano „kruche” (*ang. fragile*) nukleosomy w pobliżu niektórych startów transkrypcji. Z kolei zatrzymanie nukleosomów w aktywnych regionach wzmacniających ekspresję genów zaobserwowano w miejscach, w których wiązało się między innymi białko FoxA (Forkhead Box A)^{60,70-74}. Ze względu na nieodłączne trudności w pomiarze obłożenia i dostępności nukleosomów w obrębie dużych genomów, nie przeprowadzono jednak cało-genomowej analizy sprawdzającej który z tych typów mechanizmów może dominować podczas szybkiej regulacji ekspresji genów u złożonych eukariontów. Metoda przez nas opracowana pozwoliła na przeprowadzenie takiej analizy.

Aktywacja transkrypcji genów wymaga modyfikacji chromatyny przez kompleksy zwiększające dostępność nukleosomalnego, tzn. owiniętego wokół nukleosomów, DNA. W czasie, gdy zaczynaliśmy pracę nad projektem, którego wyniki przedstawia ta publikacja, dominująca hipoteza mówiła, że usunięcie nukleosomów z sekwencji regulatorowych odgrywa znaczącą rolę w aktywacji transkrypcji. W obliczu wyników uzyskanych przez mnie oraz moje koleżanki i kolegów¹ postanowiliśmy zrewidować tę hipotezę. Zdecydowaliśmy się sprawdzić w jaki sposób zmiany w obłożeniu nukleosomów oraz zmiany w dostępności DNA są powiązane z wywołanymi zmianami ekspresji. Jako model doświadczalny ponownie wykorzystane zostały muszki komórki S2. Zmiany w ekspresji genów zostały wywołane przez podanie 5 mM ditiotretolu (DTT), co aktywowało mechanizm obronny nazwany odpowiedzią na niepoprawnie sfałdowane białka (*ang. Unfolded Protein Response, UPR*).

UPR jest ewolucyjnie zachowaną odpowiedzią na błędne zwijanie białka, które zmienia regulację setek genów⁷⁵. W naszych badaniach dotyczących aktywacji ekspresji wykorzystaliśmy UPR, ponieważ ten proces powoduje duże zmiany komórkowe i jest ważny dla wielu aspektów fizjologicznych. UPR jest ścieżką odpowiedzi na stres, który wynika ze zmian w składaniu białka w retikulum endoplazmatycznym (ER), homeostazie wapnia lub integralności błony ER. W skrócie, w błonie ER umiejscowione są trzy receptory, których stymulacja prowadzi do aktywacji UPR. Tymi receptorami są IRE1 (Endoplasmic Reticulum to Nucleus Signaling 1), PERK (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2 Alpha Kinase 3) i ATF6 (Activating Transcription Factor 6). W odpowiedzi na stymulację aktywują one trzy czynniki transkrypcyjne: XBP-1 (X-Box Binding Protein 1), ATF4 (Activating Transcription Factor 4) oraz rozszczepiony nie-membranowy fragment ATF6. Białko IRE1 bierze udział w splicingu transkryptów XBP-1 w celu wygenerowania aktywnego czynnika transkrypcyjnego XBP-1s. Kinaza PERK fosforyluje eIF2 α (Eukaryotic Translation Initiation Factor 2A) zatrzymując ogólną translację, ale wspiera translację czynnika transkrypcyjnego ATF4. ATF6 przemieszcza się do aparatu Golgiego, gdzie jest rozszczepiony, uwalniając cytosoliczną wersję ATF6. Trzy wspomniane czynniki transkrypcyjne przenoszą się do jądra komórkowego aby zainicjować transkrypcję docelowych genów UPR. Jeśli nie uda się przywrócić homeostazy ER, UPR inicjuje apoptozę⁷⁶. Nieprawidłowa aktywacja UPR występuje w kilku chorobach. Między innymi w chorobach nowotworowych, gdzie komórki nowotworowe aktywują UPR, aby przeżyć warunki stresowe, występujące wewnątrz mikrośrodowiska guza, takie jak niedotlenienie i słaba dostępność składników odżywczych⁷⁷. Zrozumienie mechanizmów regulujących UPR może umożliwić modulację tych reakcji.

Plan eksperymentu

Aby dokładnie prześledzić zmiany dostępności i aktywności chromatyny związane z odpowiedzią na wybrany czynnik stresowy postanowiliśmy przeprowadzić pomiary w kilku punktach czasowych. Po dokładnej analizie biochemicznej, cało-genomowa analiza została przeprowadzona tuż przed traktowaniem (0h), oraz jedną godzinę (1h) i cztery godziny (4h) po traktowaniu DTT². Tak wybrane punkty czasowe pozwoliły uchwycić proces UPR we wczesnym stadium po całkowitym wygenerowaniu splecionego XBP-1 (1h), a także w późniejszym punkcie czasowym po splecionym XBP-1 przez kilka godzin (4h)². Zaobserwowaliśmy setki genów, które w obu punktach czasowych były istotnie podwyższone, a nawet takie, których ekspresja była podwyższana co najmniej dwukrotnie w kolejnych punktach czasowych. Wskazuje to, że traktowanie za pomocą DTT wywołuje szybką i ogólną reakcję transkrypcyjną.

Zmiany w obrębie genów potwierdziły aktywację procesu UPR

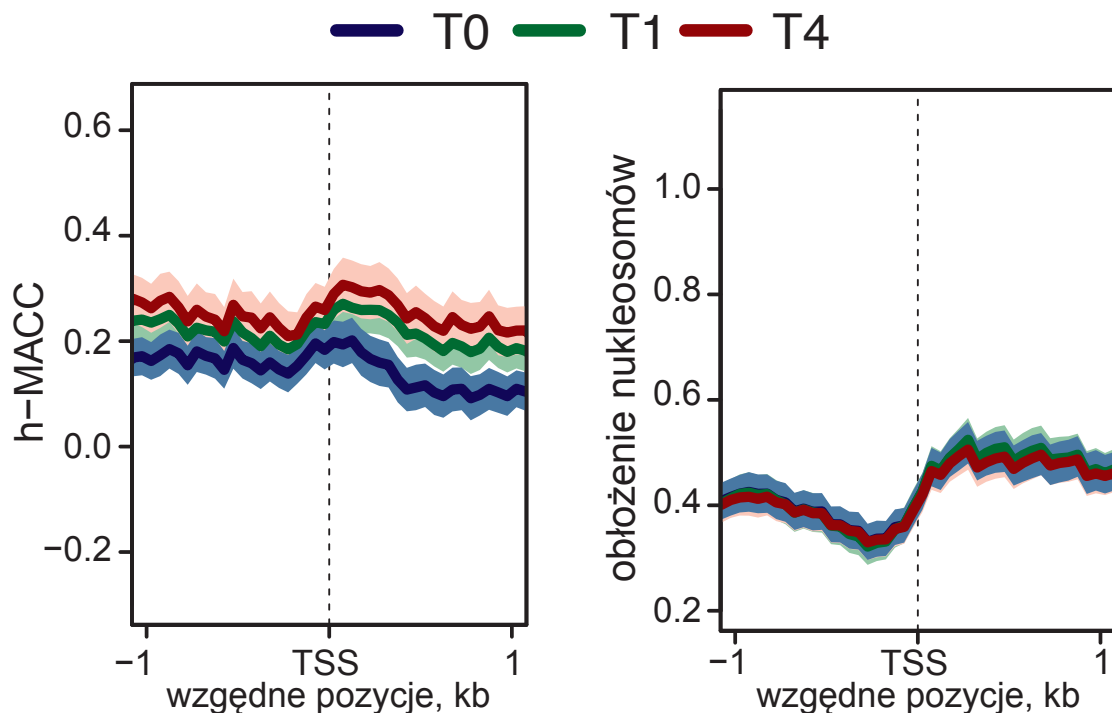
Zastosowanie opracowanej przeze mnie metody MACC pozwoliło na jednoczesną analizę dostępności DNA oraz obłożenia nukleosomów. Aby ułatwić interpretację wyników postanowiliśmy skupić uwagę na nukleosomalnych fragmentach DNA, tzn. po trawieniu enzymem mikrokokalnym zastosowana została immunoprecypitacja chromatyny z użyciem przeciwciała na białko histonowe. W ten sposób uzyskaliśmy profile h-MACC oraz profile obłożenia histonów.

W pierwszej kolejności zmierzaliśmy obłożenie nukleosomów w obrębie genów regulowanych podczas aktywacji procesu UPR. Aby określić czy nukleosomy zmieniły pozycję lub zostały utracone w trakcie UPR, skupiliśmy się na genach, których ekspresja była co najmniej dwukrotnie podniesiona po pierwszej godzinie oraz albo była dalej

podniesiona pomiędzy 1h a 4h, albo nie zmieniła istotnie swojego poziomu po pierwszej godzinie. 327 genów spełniało te kryteria. Okazało się, że przeciętne obłożenie nukleosomów wewnątrz tych genów (*ang. gene body*) nie zmieniło się w wyniku aktywacji ekspresji. Jednocześnie, w tych samych regionach istotnie wzrosła dostępność DNA. Na potrzeby tej analizy, przez wnętrze genu rozumiany był przedział między startem transkrypcji (*ang. transcription start site, TSS*) a miejscem końca transkrypcji (*ang. transcription termination site, TTS*). Aby potwierdzić te obserwacje, wykonaliśmy także niezależne pomiary obłożenia nukleosomów za pomocą standardowej metody. Potwierdziły one wyniki uzyskane za pomocą metody MACC.

MACC, a nie obłożenie nukleosomów zmieniło się wokół TSS aktywowanych genów

Chcąc uzyskać informacje na temat mechanizmów związanych z regulacją ekspresji, w pierwszej kolejności postanowiliśmy sprawdzić dostępność chromatyny i obłożenie nukleosomów w promotorach genów, których ekspresja wzrosła w wyniku wywołania UPR. Skupiliśmy się na regionach najbardziej zbliżonych do startów transkrypcji wybranych genów, które zdefiniowaliśmy jako przedział wokół TSS, co jest standardowym podejściem⁶⁵. Nie zaobserwowaliśmy ogólnego spadku obłożenia nukleosomów w tak wybranych promotorach. Z kolei w tych rejonach wyraźnie wzrosła dostępność chromatyny mierzona za pomocą naszego współczynnika h-MACC (Rys. 5). Co więcej,



Rysunek 5 Średnie profile h-MACC (lewy) oraz obłożenia nukleosomów (prawy) wokół startu transkrypcji UPR-aktywowanych genów w trzech punktach czasowych.

zgodnie z tymi obserwacjami, h-MACC mierzony w zdefiniowanych promotorach wykazywał dodatnią korelację z poziomem ekspresji genów we wszystkich trzech punktach czasowych, natomiast obłożenie nukleosomów było ujemnie skorelowane z poziomami ekspresji genów. W promotorach genów, których ekspresja była obniżona w wyniku wywołania UPR nie zaobserwowaliśmy istotnych korelacji. Tak jak w przypadku analizy obłożenia nukleosomów wewnątrz genów, nasze obserwacje dotyczące dostępności DNA potwierdziliśmy niezależną metodą. Wykorzystaliśmy metodę ATAC-

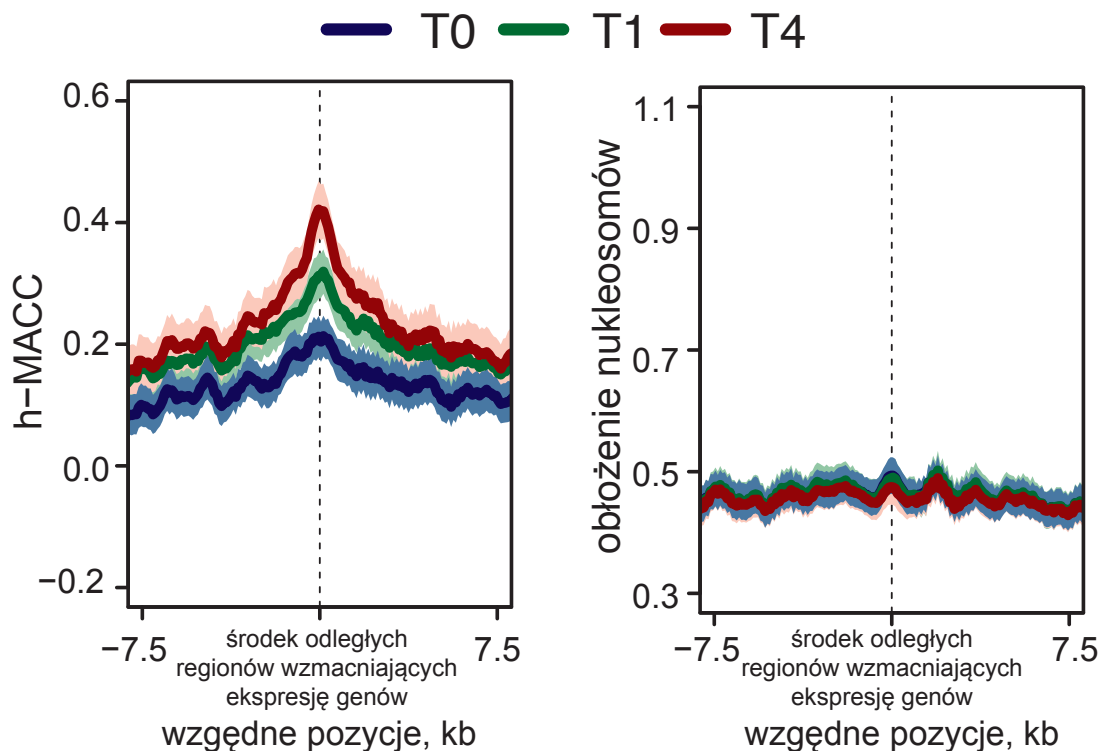
seq (ang. assay for transposase-accessible chromatin using sequencing)⁷⁸. Przeprowadzone analizy pozwoliły stwierdzić, że zwiększenie ekspresji genów wywołane aktywacją UPR związane jest z wyraźnym wzrostem dostępności nukleosomalnego DNA w obrębie tych genów, przy jednoczesnym braku zmian w obłożeniu nukleosomów w tych samych regionach.

MACC, a nie obłożenie nukleosomów zmieniło się w dystalnych regionach regulatorowych

W przypadku wielu genów zaobserwowany wzrost ekspresji był powiązany z aktywacją odległych regionów regulatorowych. Wykryliśmy w nich wzrost wzbogacenia w acetylację lizyny 27 histonu 3 (H3K27ac). Dla regionów genomowych znajdujących się daleko od genów jest to powszechnie wykorzystywany znacznik aktywności regionów wzmacniających poziom ekspresji (ang. enhancers). Uważano, że w trakcie aktywacji w takich regionach dochodzi do zubożenia w nukleosomy⁷⁹, więc postanowiliśmy sprawdzić, jak wyglądają ich profile dostępności DNA oraz obłożenia nukleosomów w trakcie aktywacji UPR.

Na potrzeby tej analizy zdefiniowaliśmy odległe regiony regulatorowe (ang. distal enhancers) jako miejsca znajdujące się z dala od startu transkrypcji, co zapewniło wybranie regionów nie analizowanych wcześniej jako promotory. Podobnie jak w przypadku ekspresji genów, analizie poddane zostały odległe regiony regulatorowe, których aktywność istotnie wzrosła w wyniku UPR. Jako kryteria przyjęliśmy co najmniej dwukrotny wzrost we wzbogaceniu w sygnał H3K27ac po pierwszej godzinie w porównaniu do sygnału przed stymulacją (0-1h) oraz po czterech godzinach w odniesieniu do jednej godziny po stymulacji (1-4h). W naszym zbiorze danych znalazły się 422 regiony spełniające określone przez nas kryteria.

Przeprowadzona analiza wykazała, że mimo wzrostu dostępności DNA, nie wystąpiło zmniejszenie w obłożeniu nukleosomów (Rys. 6). Ponadto zaobserwowany wzrost



Rysunek 6 Średnie profile h-MACC (lewy) oraz obłożenia nukleosomów (prawy) wokół zlokalizowane w odległych miejscach regulatorowych w trzech punktach czasowych.

dostępności chromatyny był wyraźnie większy w kierunku środka wybranych regionów regulatorowych. Jest to zgodne z hipotezą mówiącą, że zmiany w dostępności chromatyny powiązane są ze zmianami w profilu acetylacji lizyny 27 histony 3 (H3K27ac) za pomocą którego wybrano analizowane regiony. Wykorzystanie przez nas tylko nukleosomowego DNA do analizy dostępności DNA (h-MACC) pozwoliło nam wyciągnąć jeszcze jedną obserwację, kluczową ze względu na mechanizm aktywacji regionów regulatorowych. Otóż nasze wyniki jednoznacznie pokazały, że zmiana dostępności DNA może dominować nad zmianą obłożenia nukleosomów w trakcie aktywacji regionów regulatorowych.

Podsumowanie

Przeprowadzona przez nas analiza jednoznacznie wykazała, że odpowiedź komórkowa może być związana z globalną zmianą dostępności chromatyny bez zmian w obłożeniu nukleosomów. Jest to pierwsze doniesienie o takiej regulacji w ujęciu globalnym. Przeprowadzone przez nas eksperymenty nie pozwalają odpowiedzieć na pytanie czy jest to zjawisko specyficzne dla UPR bądź komórek muszych. Jednakże nasze badania jednoznacznie wykazały mechanizm aktywacji, który wcześniej nie był rozpatrywany.

Praca numer 3

Cook, A.*, **Mieczkowski, J.***, Tolstorukov, MY, Single-Assay Profiling of Nucleosome Occupancy and Chromatin Accessibility, *Current Protocols in Molecular Biology.*, oct 2:120:21.34-21.34.18, 2017.

*pierwsi autorzy

Powyższa praca nie opisuje nowych odkryć naukowych, ale w kontekście omawianego dzieła jest ważnym uzupełnieniem dwóch poprzednich prac. Przedstawia ona protokoły pozwalające przeprowadzić zarówno eksperymenty związane z omawianymi trawieniami DNA, jak i dogłębną analizę bioinformatyczną uzyskanych danych. Jej częścią jest nie tylko kod informatyczny, ale też pakiet obliczeniowy, który pozwala w relatywnie prosty i powtarzalny sposób przeprowadzić analizę MACC.

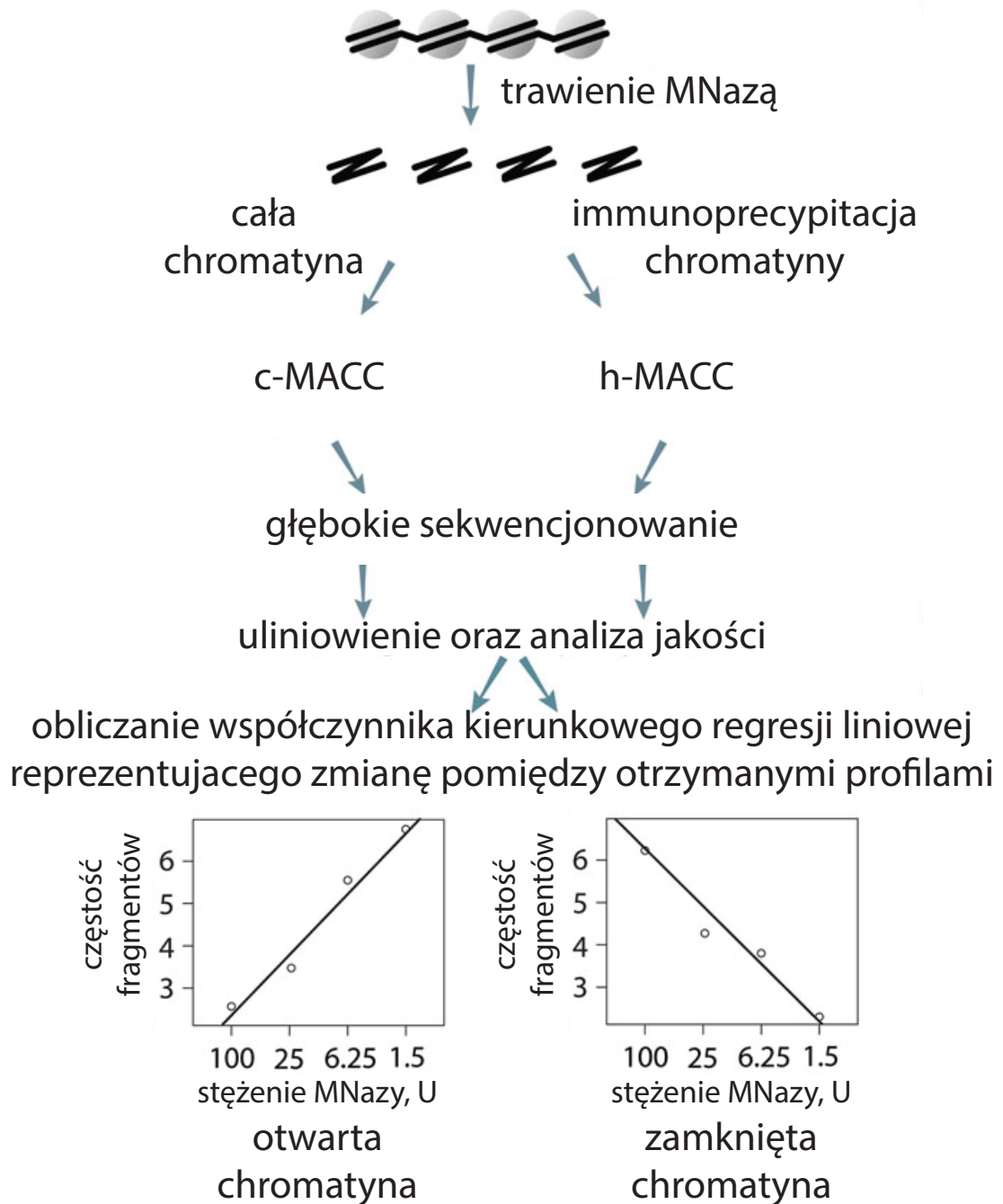
Opracowana przez nas metoda pozwala na jednoczesne profilowanie dostępności DNA, obłożenia nukleosomalnego oraz wiązania nie-histonowych białek do łańcucha DNA. Ta wszechstronność sprawia, że MACC jest odpowiednim narzędziem do analizy zmian struktury chromatyny w wielu procesach biologicznych, od regulacji genów do upakowania genomu. MACC został z powodzeniem zastosowany do analizy musz, myszy oraz ludzkich linii komórkowych¹. Protokół MACC składa się z części eksperymentalnej oraz z części obliczeniowej. Przedstawiona tu praca zawiera szczegółowy opis obu tych części, wraz z opisem rozwiązań kilku typowych problemów, które mogą pojawić w trakcie wykonywania eksperymentu przez mniej doświadczonych badaczy. Schemat kolejnych elementów analizy został przedstawiony na rysunku 7.

Protokół eksperymentalny jest przewidziany dla komórek ssaczych i przedstawiony w taki sposób, by łatwo można go było dostosować do wybranego typu komórek. Protokół obliczeniowy jest niezależny od typu komórek. Oprócz szczegółowego opisu analizy oraz przykładowych wyników, prezentowana praca przedstawia także pakiet obliczeniowy, którego jestem jedynym autorem, napisany w języku R. Pakiet ten jest ogólnodostępny i przeznaczony do środowiska R. Upubliczniony pakiet pozwala na wykonanie wszystkich analiz prezentowanych w dwóch poprzednich pracach, a także wykorzystanych w naszej analizie obłożenia histonu H3.3³.

Razem z pakietem udostępniliśmy 3 adnotacje genomowe wykorzystywane przez nas w poprzednich pracach. W związku z tym analiza próbek ludzkich, myszy oraz musz nie wymaga dodatkowej pracy i może zostać od razu rozpoczęta. W przypadku danych pochodzących z innych organizmów konieczne jest pobranie dodatkowych danych, typowych dla analiz genomu, takich jak sekwencja genomu i lokalizacja genów. Opublikowany przez nas pakiet zawiera funkcje pozwalające przygotować adnotacje genomowe dla dowolnego organizmu, dla którego znana jest sekwencja DNA. W związku z tym badacze nie są ograniczeni tylko do 3 przygotowanych przez nas adnotacji.

Aby umożliwić dokładne zrozumienie otrzymywanych wyników, obliczanie wskaźnika dostępności DNA, tzn. współczynnika MACC, zostało podzielone na kilka kroków. Każdy z tych kroków został zakodowany w osobną funkcję. Opublikowany protokół zawiera nie tylko opis kolejnych kroków potrzebnych do obliczenia MACC, ale także przykłady i dokładne wyjaśnienie obiektów otrzymywanych w kolejnych krokach analizy. Dzięki temu można łatwo analizować otrzymane wyniki oraz skorygować ewentualne błędy. Dla mniej doświadczonych osób przygotowana jest funkcja „opakowująca” (*ang. wrapper*), pozwalająca wykonać całą analizę za pomocą jednej komendy.

Omawiana publikacja przedstawia protokoły - eksperymentalny oraz analityczny - pakiet obliczeniowy pozwalający przeprowadzić analizę MACC, a także cały proces analizy wraz z omówieniem potencjalnych problemów. Jest to naturalne dopełnienie wcześniej opublikowanej metody i wyników wskazujących jej zastosowania.



Rysunek 7 Schemat przedstawiający kolejne elementy analizy MACC.

Wnioski i najważniejsze osiągnięcia

1. W przedstawionym dziele **po raz pierwszy wykazano**, że wyniki uzyskane za pomocą sekwencji trawień chromatyny z tej samej próbki pozwalają na uzyskanie fragmentów DNA z regionów o różnej aktywności, których porównanie niesie informację na temat procesów epigenetycznych.
2. Wyżej wspomniane porównanie pozwoliło **opracować nową metrykę do analizy dostępności DNA** pozwalającą w sposób ciągły scharakteryzować zarówno euchromatynę jak i heterochromatynę [MACC].
3. **Udowodniono**, że dodatnie wartości współczynnika MACC, mierzącego dostępność DNA, określają dostępne DNA oraz że współczynnik MACC jest dodatnio skorelowany z sygnałami pochodzącymi od markerów aktywnej chromatyny, np. H3K27ac.
4. **Udowodniono**, że ujemne wartości współczynnika MACC, mierzącego dostępność DNA, określają DNA o ograniczonej dostępności oraz że współczynnik MACC jest ujemnie skorelowany z sygnałami pochodzącymi od markerów nieaktywnej chromatyny, np. H3K27ac.
5. **Wykazano**, że dostępność DNA mierzona za pomocą MACC jest najwyższa w aktywnych rejonach regulatorowych, niezależnie od metody regulacji.
6. **W opozycji do uprzednio dominującej hipotezy wykazano**, że globalny wzrost dostępności do DNA nie wymusza zmian w obłożeniu nukleosomów.
7. **Wykazano**, że wzrost ekspresji genów wywołany przez UPR jest powiązany ze wzrostem dostępności DNA wewnątrz aktywowanych genów, przy jednoczesnym braku zmian w obłożeniu nukleosomów w tych genach.
8. **Wykazano**, że w aktywowanych regionach regulatorowych, bliskich (*ang. proximal*) oraz dalekich (*ang. distal*), UPR powoduje wzrost dostępności DNA bez zmian w obłożeniu nukleosomów.
9. **Wykazano**, że Aktywacja regionów regulatorowych podczas szybkiej indukcji transkrypcyjnej nie musi powodować obniżania obłożenia nukleosomów, co sugeruje, że nukleosomy nie stanowią bariery dla procesu aktywacji.

Podsumowując, przedstawione osiągnięcie naukowe opisuje innowacyjną metodę pozwalającą na analizę mechanizmów regulacji ekspresji genów zarówno w euchromatynie jak i w heterochromatynie. Na przedstawione osiągnięcie naukowe składają się trzy publikacje. Opisują one kolejno autorską metodę analizy dostępności chromatyny (praca numer 1), nowatorski wynik uzyskany za pomocą tej metody i ujawniający nieopisaną wcześniej całogenomową zmianę w regulację ekspresji (praca numer 2) oraz eksperymentalny i obliczeniowy protokół pozwalający odtworzyć opracowaną analizę (praca numer 3). Od czasu publikacji uzyskane przez nas wyniki były cytowane ponad 140 razy przyczyniając się do kolejnych odkryć naukowych.

Wyniki składające się na powyższe osiągnięcie naukowe oraz kolejne obserwacje z nich wynikające przyczyniły się do rozwoju mojej kariery naukowej i rozszerzania współpracy międzynarodowej. Po ukończeniu stażu na Uniwersytecie Harvarda i powrocie do Polski **zostałem beneficjentem dwóch grantów badawczych**. Narodowe Centrum Nauki przyznało środki na moje badania w ramach programów **Polonez** oraz **Opus**. Dodatkowo, moja aplikacja do programu Polonez została sklasyfikowana na pierwszym miejscu w panelu dotyczącym nauk o Ziemi. W obu przypadkach wyniki uzyskane w ramach opisanego dzieła tworzyły podstawę aplikacji grantowych.

Realizowanie programu Polonez umożliwiło mi nawiązanie kolejnej współpracy naukowej. Profesor **Rolf Bjerkvig** z **Uniwersytetu w Bergen**, u którego gościłem w laboratorium w ramach wyjazdu studyjnego, zaprosił mnie do współpracy nad projektem dotyczącym trójwymiarowych modeli nowotworów w kontekście wpływu mikrośrodowiska na skuteczność terapii przeciwnowotworowych. Z kolei badania finansowane w ramach programu Opus są realizowanego we współpracy z Instytutem Pomnik - Centrum Zdrowia Dziecka w Warszawie oraz **The Children's Brain Tumor Tissue Consortium w Filadelfii (USA)** i dotyczą dziecięcych nowotworów mózgu, których markerem jest mutacja w genie kodujących wariant histonu 3 (H3.3).

Rozpowszechnienie opisanych wyników międzynarodowym środowisku naukowym przełożyło się na kolejne możliwości współpracy. Między innymi profesor **Mikael Simons** pracujący w **Munich Center for Neuroscience** zaprosił mnie do badania wpływu wieku na dostępności chromatyny w komórkach glejowych w kontekście procesu remienilizacji.

Wyniki przedstawione w powyższym osiągnięciu naukowym pomogły mi rozwinąć nowe metody medycyny spersonalizowanej. Bazując na uzyskanych wynikach założyłem firmę oraz zgłosiłem wniosek patentowy dotyczący nowego sposobu identyfikacji komórek nowotworowych i dostarczania do nich substancji farmaceutycznych. Opracowana metoda dotyczy identyfikacji niefizjologicznej dostępności chromatyny i regulacji ekspresji genów. Opracowana metoda jest przedmiotem ogłoszenia patentowego.

Bibliografia

1. Mieczkowski, J. *et al.* MNase titration reveals differences between nucleosome occupancy and chromatin accessibility. *Nat. Commun.* **7**, 11485 (2016).
2. Mueller, B. *et al.* Widespread changes in nucleosome accessibility without changes in nucleosome occupancy during a rapid transcriptional induction. *Genes Dev.* **31**, 451–462 (2017).
3. Deaton, A. M. *et al.* Enhancer regions show high histone H3.3 turnover that changes during differentiation. *Elife* **5**, 1–24 (2016).
4. Cook, A. *et al.* Single-Assay Profiling of Nucleosome Occupancy and Chromatin Accessibility. in *Current Protocols in Molecular Biology* 21.34.1-21.34.18 (John Wiley & Sons, Inc., 2017). doi:10.1002/cpmb.45
5. Wang, X. *et al.* SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation. *Nat. Genet.* **49**, 289–295 (2017).
6. Roberts, C. W. M. & Orkin, S. H. The SWI/SNF complex--chromatin and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **4**, 133–142 (2004).
7. Kelly, T. K., De Carvalho, D. D. & Jones, P. a. Epigenetic modifications as therapeutic targets. *Nat. Biotechnol.* **28**, 1069–1078 (2010).
8. Rea, M. *et al.* Quantitative Mass Spectrometry Reveals Changes in Histone H2B Variants as Cells Undergo Inorganic Arsenic-Mediated Cellular Transformation. *Mol. Cell. Proteomics* **15**, 2411–2422 (2016).
9. Adam, S., Dabin, J., Bai, S.-K. & Polo, S. E. Imaging Local Deposition of Newly Synthesized Histones in UVC-Damaged Chromatin. in *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **1288**, 337–347 (2015).
10. Frost, B., Hemberg, M., Lewis, J. & Feany, M. B. Tau promotes neurodegeneration through global chromatin relaxation. *Nat. Neurosci.* **17**, 357–366 (2014).
11. Deniz, Ö., Flores, O., Aldea, M., Soler-López, M. & Orozco, M. Nucleosome architecture throughout the cell cycle. *Sci. Rep.* **6**, 19729 (2016).
12. Sitbon, D., Podsypanina, K., Yadav, T. & Almouzni, G. Shaping Chromatin in the Nucleus: The Bricks and the Architects. *Cold Spring Harb. Symp. Quant. Biol.* 033753 (2017). doi:10.1101/sqb.2017.82.033753
13. Jiang, C. & Pugh, B. F. Nucleosome positioning and gene regulation: advances through genomics. *Nat. Rev. Genet.* **10**, 161–172 (2009).
14. Malik, H. S. & Henikoff, S. Phylogenomics of the nucleosome. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 882–91 (2003).
15. Kornberg, R. D. Chromatin Structure: A Repeating Unit of Histones and DNA. *Science* **184**, 868–871 (1974).
16. Richmond, T. J., Luger, K., Mäder, A. W., Richmond, R. K. & Sargent, D. F. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8[thinsp] resolution. *Nature* **389**, 251–260 (1997).
17. Li, B., Carey, M. & Workman, J. L. The Role of Chromatin during Transcription. *Cell* **128**, 707–719 (2007).
18. Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. & Hörz, W. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5**, 2689–96 (1986).
19. Clapier, C. R. & Cairns, B. R. The biology of chromatin remodeling complexes. *Annu. Rev. Biochem.* **78**, 273–304 (2009).
20. Henikoff, S., Henikoff, J. G., Sakai, A., Loeb, G. B. & Ahmad, K. Genome-wide profiling of salt fractions maps physical properties of chromatin. *Genome Res.* **19**, 460–469 (2009).
21. Shogren-Knaak, M. *et al.* Histone H4-K16 acetylation controls chromatin structure and protein interactions. *Science* **311**, 844–7 (2006).
22. Jin, C. *et al.* H3.3/H2A.Z double variant-containing nucleosomes mark 'nucleosome-free regions' of active promoters and other regulatory regions. *Nat. Genet.* **41**, 941–5 (2009).
23. Peckham, H. E. *et al.* Nucleosome positioning signals in genomic DNA. *Genome Res.*

- 17, 1170–7 (2007).
24. Segal, E. & Widom, J. What controls nucleosome positions? *Trends Genet.* **25**, 335–43 (2009).
 25. Sun, X. *et al.* Arid1a Has Context-Dependent Oncogenic and Tumor Suppressor Functions in Liver Cancer. *Cancer Cell* **32**, 574–589.e6 (2017).
 26. Valdés-Mora, F. *et al.* Acetylated histone variant H2A.Z is involved in the activation of neo-enhancers in prostate cancer. *Nat. Commun.* **8**, 1346 (2017).
 27. Qu, K. *et al.* Chromatin Accessibility Landscape of Cutaneous T Cell Lymphoma and Dynamic Response to HDAC Inhibitors. *Cancer Cell* **32**, 27–41.e4 (2017).
 28. Wu, Y. *et al.* Tamoxifen resistance in breast cancer is regulated by the EZH2-ER α -GREB1 transcriptional axis. *Cancer Res.* canres.1327.2017 (2017). doi:10.1158/0008-5472.CAN-17-1327
 29. Kar, S. & Patra, S. K. Overexpression of OCT4 induced by modulation of histone marks plays crucial role in breast cancer progression. *Gene* **643**, 35–45 (2018).
 30. Briere, D. *et al.* The class I/IV HDAC inhibitor mocetinostat increases tumor antigen presentation, decreases immune suppressive cell types and augments checkpoint inhibitor therapy. *Cancer Immunol. Immunother.* (2017). doi:10.1007/s00262-017-2091-y
 31. Segal, E. *et al.* A genomic code for nucleosome positioning. *Nature* **442**, 772–778 (2006).
 32. Zhang, Z. & Pugh, B. F. High-resolution genome-wide mapping of the primary structure of chromatin. *Cell* **144**, 175–86 (2011).
 33. Sadeh, R. & Allis, C. D. Genome-wide “-modeling of nucleosome positions. *Cell* **147**, 263–6 (2011).
 34. Mack, S. C., Hubert, C. G., Miller, T. E., Taylor, M. D. & Rich, J. N. An epigenetic gateway to brain tumor cell identity. *Nat. Neurosci.* **19**, 10–9 (2016).
 35. Héninger, E., Krueger, T. E. G. & Lang, J. M. Augmenting antitumor immune responses with epigenetic modifying agents. *Front. Immunol.* **6**, 29 (2015).
 36. Chiappinelli, K. B., Zahnow, C. A., Ahuja, N. & Baylin, S. B. Combining Epigenetic and Immunotherapy to Combat Cancer. *Cancer Res.* **76**, 1683–9 (2016).
 37. Peng, D. *et al.* Epigenetic silencing of TH1-type chemokines shapes tumour immunity and immunotherapy. *Nature* **527**, 249–253 (2015).
 38. Knüpfer, M. M., Hernáiz-Driever, P., Poppenborg, H., Wolff, J. E. & Cinatl, J. Valproic acid inhibits proliferation and changes expression of CD44 and CD56 of malignant glioma cells in vitro. *Anticancer Res.* **18**, 3585–9
 39. Hashizume, R. *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. *Nat. Med.* **20**, 1394–1396 (2014).
 40. Schwartzentruber, J. *et al.* Driver mutations in histone H3.3 and chromatin remodelling genes in paediatric glioblastoma. *Nature* **482**, 226–231 (2012).
 41. Kim, E. *et al.* Phosphorylation of EZH2 Activates STAT3 Signaling via STAT3 Methylation and Promotes Tumorigenicity of Glioblastoma Stem-like Cells. *Cancer Cell* **23**, 839–852 (2013).
 42. Sareddy, G. R. *et al.* Novel KDM1A inhibitors induce differentiation and apoptosis of glioma stem cells via unfolded protein response pathway. *Oncogene* **36**, 2423–2434 (2017).
 43. Singh, M. M. *et al.* Inhibition of LSD1 sensitizes glioblastoma cells to histone deacetylase inhibitors. *Neuro. Oncol.* **13**, 894–903 (2011).
 44. Henssen, A. *et al.* BET bromodomain protein inhibition is a therapeutic option for medulloblastoma. *Oncotarget* **4**, 2080–95 (2013).
 45. Venkataraman, S. *et al.* Inhibition of BRD4 attenuates tumor cell self-renewal and suppresses stem cell signaling in MYC driven medulloblastoma. *Oncotarget* **5**, 2355–71 (2014).
 46. Auerbach, R. K. *et al.* Mapping accessible chromatin regions using Sono-Seq. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14926–14931 (2009).
 47. Giresi, P. G., Kim, J., McDaniel, R. M., Iyer, V. R. & Lieb, J. D. FAIRE (Formaldehyde-

- Assisted Isolation of Regulatory Elements) isolates active regulatory elements from human chromatin. *Genome Res.* **17**, 877–885 (2007).
48. Zaret, K. Micrococcal Nuclease Analysis of Chromatin Structure. in *Current Protocols in Molecular Biology* **Chapter 21**, Unit 21.1 (John Wiley & Sons, Inc., 2005).
 49. Song, L. & Crawford, G. E. DNase-seq: A high-resolution technique for mapping active gene regulatory elements across the genome from mammalian cells. *Cold Spring Harb. Protoc.* **5**, 1–12 (2010).
 50. Bell, O., Schwaiger, M., Oakeley, E. & Lienert, F. Accessibility of the Drosophila genome discriminates PcG repression, H4K16 acetylation and replication timing. *Nat. Struct.* (2010).
 51. Kelly, T. K. *et al.* Genome-wide mapping of nucleosome positioning and DNA methylation within individual DNA molecules. *Genome Res.* **22**, 2497–2506 (2012).
 52. Buenrostro, J. J. D., Giresi, P. P. G., Zaba, L. C. L., Chang, H. H. Y. & Greenleaf, W. J. Transposition of native chromatin for fast and sensitive epigenomic profiling of open chromatin, DNA-binding proteins and nucleosome position. **10**, 1213–1218 (2013).
 53. West, J. A. *et al.* Nucleosomal occupancy changes locally over key regulatory regions during cell differentiation and reprogramming. *Nat. Commun.* **5**, 4719 (2014).
 54. Chung, H.-R. *et al.* The effect of micrococcal nuclease digestion on nucleosome positioning data. *PLoS One* **5**, e15754 (2010).
 55. Dingwall, C., Lomonosoff, G. P. & Laskey, R. A. High sequence specificity of micrococcal nuclease. *Nucleic Acids Res.* **9**, 2659–73 (1981).
 56. Weiner, A., Hughes, A., Yassour, M., Rando, O. J. & Friedman, N. High-resolution nucleosome mapping reveals transcription-dependent promoter packaging. *Genome Res.* **20**, 90–100 (2010).
 57. Almer, A., Rudolph, H., Hinnen, A. & Hörz, W. Removal of positioned nucleosomes from the yeast PHO5 promoter upon PHO5 induction releases additional upstream activating DNA elements. *EMBO J.* **5**, 2689–96 (1986).
 58. Tolstorukov, M. Y., Kharchenko, P. V & Park, P. J. Analysis of the primary structure of chromatin with next-generation sequencing. *Epigenomics* **2**, 187–197 (2010).
 59. Bryant, G. O. *et al.* Activator control of nucleosome occupancy in activation and repression of transcription. *PLoS Biol.* **6**, 2928–2939 (2008).
 60. Xi, Y., Yao, J., Chen, R., Li, W. & He, X. Nucleosome fragility reveals novel functional states of chromatin and poises genes for activation. *Genome Res.* **21**, 718–24 (2011).
 61. Rizzo, J. M., Bard, J. E. & Buck, M. J. Standardized collection of MNase-seq experiments enables unbiased dataset comparisons. *BMC Mol. Biol.* **13**, 15 (2012).
 62. Ishii, H., Kadonaga, J. T. & Ren, B. MPE-seq, a new method for the genome-wide analysis of chromatin structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, E3457–65 (2015).
 63. Kaplan, N., Hughes, T. R., Lieb, J. D., Widom, J. & Segal, E. Contribution of histone sequence preferences to nucleosome organization: Proposed definitions and methodology. *Genome Biol.* **11**, (2010).
 64. Woo, C. J., Kharchenko, P. V., Daheron, L., Park, P. J. & Kingston, R. E. A Region of the Human HOXD Cluster that Confers Polycomb-Group Responsiveness. *Cell* **140**, 99–110 (2010).
 65. Roy, S. *et al.* Identification of functional elements and regulatory circuits by Drosophila modENCODE. *Science* **330**, 1787–1797 (2010).
 66. Peterson, C. L. & Workman, J. L. Promoter targeting and chromatin remodeling by the SWI/SNF complex. *Curr. Opin. Genet. Dev.* **10**, 187–192 (2000).
 67. Narlikar, G. J., Fan, H.-Y. & Kingston, R. E. Cooperation between Complexes that Regulate Chromatin Structure and Transcription. *Cell* **108**, 475–487 (2002).
 68. Mavrich, T. N. *et al.* Nucleosome organization in the Drosophila genome. *Nature* **453**, 358–62 (2008).
 69. Yuan, G.-C. *et al.* Genome-scale identification of nucleosome positions in *S. cerevisiae*. *Science* **309**, 626–30 (2005).
 70. Sexton, T. *et al.* Three-dimensional folding and functional organization principles of the Drosophila genome. *Cell* **148**, 458–472 (2012).

71. Teif, V. B. *et al.* Nucleosome repositioning links DNA (de)methylation and differential CTCF binding during stem cell development. *Genome Res.* **24**, 1285–1295 (2014).
72. Iwafuchi-Doi, M. *et al.* The Pioneer Transcription Factor FoxA Maintains an Accessible Nucleosome Configuration at Enhancers for Tissue-Specific Gene Activation. *Mol. Cell* **62**, 79–91 (2016).
73. Knight, B. *et al.* Two distinct promoter architectures centered on dynamic nucleosomes control ribosomal protein gene transcription. *Genes Dev.* **28**, 1695–709 (2014).
74. Soufi, A. *et al.* Pioneer transcription factors target partial DNA motifs on nucleosomes to initiate reprogramming. *Cell* **161**, 555–568 (2015).
75. Hollien, J. & Weissman, J. S. Decay of Endoplasmic Reticulum-Localized mRNAs During the Unfolded Protein Response. *Science (80-.)*. **313**, 104–107 (2006).
76. Walter, P. & Ron, D. The Unfolded Protein Response: PERK. *Science (80-.)*. **334**, 1081–1087 (2011).
77. Grootjans, J., Kaser, A., Kaufman, R. J. & Blumberg, R. S. The unfolded protein response in immunity and inflammation. *Nat. Rev. Immunol.* **16**, 469–484 (2016).
78. Buenrostro, J. D., Wu, B., Chang, H. Y. & Greenleaf, W. J. ATAC-seq: A method for assaying chromatin accessibility genome-wide. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* **2015**, 21.29.1-21.29.9 (2015).
79. Schaffner, W. Enhancers, enhancers - From their discovery to today's universe of transcription enhancers. *Biol. Chem.* **396**, 311–327 (2015).

5. Informacje o wykazaniu się istotną aktywnością naukową realizowaną w więcej niż jednej uczelni, instytucji naukowej w szczególności zagranicznej

- Deaton, AM., Gomez-Rodriguez, M., **Mieczkowski, J.**, Tolstorukov, MY., Kundu, S., Sadreyev, RI., Jansen, LET., Kingston, RE., Enhancer regions show high histone H3.3 turnover that changes during differentiation. *eLife*, 5:e15316, 2016.

IF:7.725; MNiSW: 45 (zgodnie z rokiem opublikowania)

Wyniki opisane w tej pracy powstały dzięki współpracy pracowników naukowych pracujących w Harvard Medical School (Boston, USA) oraz Instituto Gulbenkian de Ciencia (Oeiras, Portugalia). Jako pracownik Harvard Medical School byłem odpowiedzialny za przygotowanie statystycznego planu eksperymentów, nadzorowanie analiz bioinformatycznych, pomoc w interpretacji wyników oraz pisanie manuskryptu.

- Wang, X.*, Lee, RS.*, Alver, BH.*, Haswell, JR., Wang, S., **Mieczkowski, J.**, Drier, Y., Gillespie, SM., Archer, TC., Wu, JN., Tzvetkov, EP., Troisi, EC., Pomeroy, SL., Biegel, JA., Tolstorukov, MY., Bernstein, BE., Park, PJ., Roberts, CW., SMARCB1-mediated SWI/SNF complex function is essential for enhancer regulation, *Nat. Genetics*, 49(2):289-295, 2017. * pierwsi autorzy

IF:27.125; MNiSW: 50 (zgodnie z rokiem opublikowania)

Wyniki opisane w tej pracy powstały dzięki współpracy pracowników naukowych pracujących między innymi w Harvard Medical School, Boston Children's Hospital, Broad Institute of MIT (Boston, USA) oraz University of Southern California (Los Angeles, USA). Jako pracownik Harvard Medical School byłem odpowiedzialny za przygotowanie analiz cało-genomowych profili wiązania się do chromatyny białek wchodzących w skład kompleksu białkowego SWI/SNF oraz interpretację wyników.

- Garofalo, S., Porzia, A., Mainiero, F., Di Angelantonio, S., Cortese, B., Basilico, B., Pagani, F., Cignitti, G., Chece, G., Maggio, R., Tremblay, ME., Savage, J., Bisht, K., Esposito, V., Bernardini, G., Seyfried, T., **Mieczkowski, J.**, Stepniak, K., Kaminska, B., Santoni, A., Limatola, C., Environmental stimuli shape microglial plasticity in glioma, *Elife*, 2017 Dec 29;6

IF:7.716; MNiSW: 45 (zgodnie z rokiem opublikowania)

Wyniki opisane w tej pracy powstały dzięki współpracy pracowników naukowych pracujących między innymi w IRCCS Neuromed (Pozzilli, Włochy), Sapienza University, Institute of Nanotechnology (Rzym, Włochy) oraz Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego (Warszawa). Jako pracownik Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego byłem odpowiedzialny za przeprowadzenie cało-genomowej analizy ekspresji genów oraz interpretację wyników.

- Ulanska-Poutanen, J., **Mieczkowski, J.**, Zhao, C., Konarzewska, K., Kaza, B., Pohl, HBF., Bugajski, L., Kaminska, B., Franklin, RJM., Zawadzka, M., Injury-induced

perivascular niche supports alternative differentiation of adult rodent CNS progenitor cells, *Elife*, 2018 Sep 17;7

IF:7.551; MNiSW: 45 (zgodnie z rokiem opublikowania)

Wyniki opisane w tej pracy powstały dzięki współpracy pracowników naukowych pracujących w University of Cambridge (Cambridge, Anglia), Institute of Molecular Health Sciences (Zurich, Szwajcaria) oraz Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego (Warszawa). Jako pracownik Instytutu Biologii Doświadczalnej im. Nenckiego byłem odpowiedzialny za przygotowanie statystycznego planu eksperymentów, analizę całogenomowych danych transkryptomicznych oraz interpretację wyników.

6. Informacja o osiągnięciach dydaktycznych, organizacyjnych oraz popularyzujących naukę

Mimo, że większość mojej zawodowej kariery pracowałem w jednostkach o profilu wyłącznie naukowym, brałem czynny udział w kształceniu i promocji nauki:

- Byłem **promotorem studentki studiów licencjackich**, Anity Urbanovich, której praca na wydziale Matematyki, Informatyki i Mechaniki Uniwersytetu Warszawskiego **uzyskała wyróżnienie**.
- W ramach Pracowni Neurobiologii Molekularnej w Instytucie Nenckiego PAN kierowałem dwuosobową podgrupą złożoną z doktoranta oraz post-doca. Jestem **promotorem pomocniczym** kierowanego przeze mnie doktoranta (obecnie na 3 roku studiów).
- Prowadziłem **wykłady dla studentów** Uniwersytetu Warszawskiego na wydziałach Matematyki, Informatyki i Mechaniki oraz Biologii.
- Prowadziłem także **cykliczne szkolenia** ze statystyki dla doktorantów Studium Medycyny Molekularnej.
- Uczestniczyłem w **europejskim programie COST** (European Cooperation in Science and Technology).
- **Recenzowałem** prace naukowe w anglojęzycznych czasopismach znajdujących się na liście filadelfijskiej takich jak: *Scientific Reports*, *Genetic Testing and Molecular Biomarker*, *PLoS One* oraz *Clinical Epigenetics*.
- Prowadzona przeze mnie grupa badawcza na Gdańskim Uniwersytecie Medycznym składa się z post-doca oraz doktoranta, którego jestem **promotorem pomocniczym**.

7. Inne informacje, ważne z punktu widzenia kariery zawodowej.

- **Dane bibliometryczne**

Autor lub współautor: 21 publikacji w czasopiśmie polskich i zagranicznych, w tym: 20 oryginalnych publikacji naukowych (zagranicznych) oraz 1 rozdziału w książce (Springer),

Sumaryczny impact factor według listy Journal Citation Reports, zgodnie z rokiem opublikowania: 108,306

Liczba cytowań (bez autocytowań) publikacji według bazy Web of Science: 472

Indeks Hirscha według bazy Web of Science (WoS): 12

Szczegółowe dane bibliometryczne znajdują się w załączniku nr 4.

- **Działalność wdrożeniowa**

2018 - obecnie - współzałożyciel firmy Genegoggle Sp. z o.o. oferującej nowatorskie metody identyfikacji komórek patologicznych oparte o zmiany epigenetyczne

2019 - aplikacja patentowa w Szwedzkim urzędzie patentowym

Methods for identifying candidates selectively binding to a locus, and related systems, reference number, Szwedzki Numer Aplikacji Patentowej 19550573-4

Oświadczam, że nie ubiegałem się uprzednio o nadanie stopnia doktora habilitowanego.