

Autoreferat

1. Imię i Nazwisko. **Andrzej Wierzbicki**

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe/ artystyczne – z podaniem nazwy, miejsca i roku ich uzyskania oraz tytułu rozprawy doktorskiej.

- doktor, 2003, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, „Analiza funkcji histonu H1 w tytoniu i Arabidopsis”
- magister, 2000, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych/ artystycznych.

- 2009 – do chwili obecnej, University of Michigan, Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, Assistant Professor
- 2005-2009, Washington University in St. Louis, Biology Department, Postdoctoral Research Associate
- 2003-2005, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, adiunkt
- 2000-2003, Uniwersytet Warszawski, Wydział Biologii, doktorant

4. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 ustawy z dnia 14 marca 2003 r. o stopniach naukowych i tytule naukowym oraz o stopniach i tytule w zakresie sztuki (Dz. U. nr 65, poz. 595 ze zm.):

a) tytuł osiągnięcia naukowego/artystycznego, **Mechanizm działania niekodujących RNA w transkrypcyjnym wyciszaniu genów**

b) (autor/autorzy, tytuł/tytuły publikacji, rok wydania, nazwa wydawnictwa),

1. **Wierzbicki AT**, Haag JR, Pikaard CS (2008) Noncoding transcription by RNA Polymerase Pol IVb/ Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135: 635-648

2. **Wierzbicki AT**, Ream TS, Haag JR, Pikaard CS. (2009) RNA Polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nature Genetics* 41:630-634

c) omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania.

Regulacja ekspresji genów jest jednym z podstawowych procesów kontrolujących funkcjonowanie organizmów żywych. Zsekwencjonowanie genomów szeregu organizmów eukariotycznych pokazało, że bez dogłębnego wyjaśnienia mechanizmów regulacji ekspresji genów niemożliwe jest zrozumienie informacji zawartych w sekwencji DNA. Jednym z najbardziej intrygujących mechanizmów kontrolujących aktywność genomów jest transkrypcyjne wyciszanie genów, w roślinach znane jako metylacja DNA zależna od RNA (RNA-dependent DNA methylation, RdDM). Proces ten kontroluje aktywność transpozonów oraz innych powtarzających się sekwencji, których uaktywnienie może być szkodliwe dla organizmu. Pośrednio, przez transpozony obecne w sekwencjach regulatorowych genów, RdDM reguluje też aktywność szeregu genów kodujących białka.

Mechanizm RdDM jest w dużej mierze podobny do interferencji RNA, tylko zamiast wpływać na aktywność genów przez degradację mRNA, kontroluje modyfikacje chromatyny i wycisza geny przez ustanowienie metylacji DNA i posttranslacyjnych modyfikacji histonów. Działanie RdDM opiera się na współdziałaniu dwóch klas niekodującego RNA (non-coding RNA, ncRNA). Jedną klasą to małe RNA (small interfering RNA, siRNA), które rozpoznają konkretne sekwencje DNA i kierują modyfikacje chromatyny do otaczających je obszarów. Drugą klasą to długie niekodujące RNA (long non-coding RNA, lncRNA). Pozostawała ona do niedawna nieznaną i odkrycie jej oraz wyjaśnienie podstawowego mechanizmu jej działania stanowi główne osiągnięcie wymienionych wyżej prac.

Punktem wyjścia było odkrycie, że genomy roślinne zawierają geny kodujące podjednostki polimerazy RNA istotnie różniących się od typowych polimeraz eukariotycznych (Onodera et al., 2005). Polimerazy te okazały się pełnić istotną rolę w RdDM, jednak mechanizm ich działania pozostawał nieznanym (Herr et al., 2005; Kanno et al., 2005; Onodera et al., 2005; Pontier et al., 2005). Nie tylko nie wiadomo było, jaka jest funkcja produkowanych przez te polimerazy transkryptów, ale wręcz istniały przypuszczenia, że mogą one mieć zupełnie inne aktywności enzymatyczne niż klasyczne polimerazy RNA zależne od DNA.

Mój wkład w rozszyfrowanie mechanizmu działania jednej z tych polimeraz znanej jako Pol V (RNA Polymerase V) zaczął się od obserwacji, że w *Arabidopsis thaliana* istnieje grupa transkryptów, które można wykryć w dzikich roślinach, lecz są niewykrywalne w mutancie nieposiadającym największej podjednostki Pol V. Transkrypty te powstają w niekodujących obszarach genomu i są znacząco dłuższe od siRNA, są więc najprawdopodobniej lncRNA. Następnie badając oddziaływanie Pol V z DNA i z lncRNA oraz sprawdzając zachowanie mutantu Pol V z uszkodzonym centrum aktywnym udało się ustalić, że Pol V jest polimerazą RNA zależną od DNA i

najprawdopodobniej bezpośrednio produkuje lncRNA. Dalej wykorzystując mutant w centrum aktywnym byłem w stanie pokazać, że produkcja lncRNA przez Pol V jest niezbędna do transkrypcyjnego wyciszenia innych polimeraz RNA transkrybujących położone w pobliżu transpozony. Wyciszenie to jest powodowane przez metylację DNA i posttranslacyjne modyfikacje histonów. Wreszcie na koniec udało się ustalić, że produkcja lncRNA przez Pol V nie wymaga obecności siRNA lub metylacji DNA, natomiast jest zależna od białka DRD1, które jest niezbędne aby Pol V mogła wiązać się do chromatyny. Wyniki te zostały opublikowane w pierwszej z prac będących częścią wskazanego osiągnięcia (Wierzbicki et al., 2008).

Bezpośrednia kontynuacja opisanych eksperymentów polegała na próbie ustalenia molekularnego mechanizmu działania lncRNA produkowanego przez Pol V. Badania te skupiły się na dwóch białkach wytypowanych na podstawie danych genetycznych. Pierwsze z tych białek, DMS3, okazało się mieć funkcję podobną co DRD1. Jest ono niezbędne do wiązania Pol V do chromatyny i do produkcji lncRNA. Drugie białko, ARGONAUTE4 (AGO4), nie jest niezbędne do produkcji lncRNA. Okazało się natomiast, że wiąże się ono z chromatyną i wiązanie to wymaga aktywności Pol V. Co więcej, AGO4 bezpośrednio oddziałuje z lncRNA produkowanym przez Pol V. Wyniki te zostały opublikowane w drugiej z prac będących częścią wskazanego osiągnięcia (Wierzbicki et al., 2009).

Na podstawie opisanych wyżej badań zaproponowaliśmy model działania lncRNA w transkrypcyjnym wyciszeniu genów przez RdDM. Pol V produkuje lncRNA na matrycy DNA. DRD1 i DMS3 są niezbędne aby Pol V przyłączyła się do DNA i rozpoczęła transkrypcję. lncRNA pozostaje przynajmniej przez pewien czas związany z produkującą go polimerazą i stanowi punkt zaczepienia dla AGO4. AGO4 rozpoznaje *locus* w genomie przez bezpośrednie oddziaływanie włączonego weń siRNA z lncRNA. Związany AGO4 następnie kieruje metylotransferazą DNA i enzymy modyfikujące histony. Modyfikacje chromatyny wyciszają transkrypcję transpozonów przez inne polimerazy RNA (Wierzbicki et al., 2009).

Zaproponowany przez nas model został w ciągu następnych paru lat przyjęty przez środowisko naukowe (Law and Jacobsen, 2010). Dalsze badania, w których część byłem bezpośrednio zaangażowany pozwoliły znacząco rozszerzyć ten model. Pokazały zaangażowanie Pol II wraz z kompleksem Mediator (Kim et al., 2011; Zheng et al., 2009). Pozwoliły zidentyfikować dwa białka wiążące lncRNA, z których jedno działa równoległe do AGO4 (Bies-Etheve et al., 2009; He et al., 2009; Rowley et al., 2011), a drugie wiąże dwuniciowy RNA i rekrutuje inne białka wpływające na strukturę chromatyny (Ausin et al., 2009, 2012; Xie et al., 2012a, 2012b; Zhang et al., 2012; Zhu et al., 2013). Pokazały, że lncRNA rekrutuje kompleks przebudowujący chromatynę i wpływa na

pozycjonowanie nukleosomów (Zhu et al., 2013). Pokazały wreszcie działanie lncRNA w perspektywie całego genomu i wskazały, że główną funkcją lncRNA może być nie wyciszenie transpozonów a regulacja ekspresji genów (Wierzbicki et al., 2012; Zheng et al., 2013; Zhong et al., 2012). Aktualny stan wiedzy w tej dziedzinie opisany jest w niedawnym artykule przeglądowym (Wierzbicki, 2012).

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych (artystycznych).

Pierwsza część opisywanego dorobku powstała w grupie prof. dr hab. Andrzeja Jerzmanowskiego, gdzie zajmowałem się białkami strukturalnymi chromatyny. Histon H1 (zwany również jako histon łącznikowy) jest szczególnie ciekawym białkiem z tej grupy. Jest silnie konserwowany ewolucyjnie i występuje w znacznych ilościach w jądrach praktycznie wszystkich organizmów eukariotycznych. Pomimo to, w przeciwieństwie do intensywnie badanych histonów rdzeniowych, jego funkcja pozostaje nieznana. W mojej pracy wykorzystałem podejście genetyczne. Najpierw używając metody antysensownego RNA wyciszyłem ekspresję czterech z sześciu wariantów H1 w tytoniu (*Nicotiana tabacum*). Zaskakujące wyniki tego eksperymentu pokazały, że rośliny niezwykle dobrze tolerują manipulacje proporcji wariantów H1 i pozostałe dwa warianty były w stanie skompensować skutki przeprowadzonej manipulacji (Przewłoka et al., 2002). Podobne podejście zastosowane w *Arabidopsis* pozwoliło na wyciągnięcie dalej idących wniosków. Wyciszenie wszystkich trzech wariantów H1 metodą interferencji RNA pokazało, że histon H1 jest niezbędny do utrzymania prawidłowego poziomu metylacji DNA (Wierzbicki and Jerzmanowski, 2005). Choć w ciągu ostatnich ośmiu lat postęp w badaniach nad H1 był raczej wolny, wyniki te ostatnio doczekały się potwierdzenia i rozszerzenia przez inną grupę (Zemach et al., 2013).

Drugą grupę opisywanych prac stanowią publikacje powstałe podczas stażu podoktorskiego, które obejmują różne aspekty kontroli aktywności genomu przez lncRNA. Pierwsza z nich to ustalenie budowy kompleksów polimeraz IV i V (Ream et al., 2009), które było znaczącym krokiem ku zrozumieniu ewolucji i funkcji tych polimeraz. Kolejna to dokonana we współpracy z grupą dr Jian-Kang Zhu charakteryzacja białka KTF1/SPT5L (He et al., 2009), które odgrywa znaczącą rolę w kierowaniu metylacji DNA. Luźniej związana jest praca, w której opisaliśmy znaczenie międzygenowych transkryptów w regulacji ekspresji rybosomalnego RNA (Earley et al., 2010). Do tej grupy należy również artykuł przeglądowy opisujący uwcześniejszy stan wiedzy na ten temat (Pikaard et al., 2008). Najbardziej znacząca jest jednak praca, w której pokazaliśmy miejsca wiązania i aktywności Pol V w skali całego genomu (Wierzbicki et al., 2012).

Trzecia grupa prac to publikacje powstałe w mojej grupie na University of Michigan. Pierwsza z nich to próba ustalenia mechanizmu działania białka KTF1/SPT5L w RdDM (Rowley et al., 2011). SPT5L jest paralogiem czynnika elongacyjnego powiązanego z polimerazą RNA II. Związany jest on funkcjonalnie z Pol V, jednak nie jest niezbędny do wiązania Pol V z DNA ani elongacji transkrypcji Pol V. SPT5L sam wiąże się do DNA w sposób zależny od Pol V. Wiązanie to jednak następuje w sposób inny niż w przypadku AGO4, gdyż jest niezależne od dostępności siRNA. Oba białka (SPT5L i AGO4) wiążą się z chromatyną niezależnie od siebie i – przynajmniej na zbadanych loci – oba są niezbędne do metylacji DNA i wyciszania genów. Pozwoliło to zaproponować, że SPT5L i AGO4 wspólnie tworzą warunki do wiązania metylotransferazy DNA. Druga praca również skupia się na białkach wiążących lncRNA (Zhu et al., 2013). W pracy tej pokazaliśmy, że lncRNA produkowane przez Pol V oddziałują z białkiem IDN2. Z kolei IDN2 oddziałuje z podjednostką kompleksu remodelującego chromatynę SWI/SNF. Kompleks ten okazał się być czynnikiem biorącym udział w RdDM, ściśle funkcjonalnie powiązanym z lncRNA. Okazało się również, że lncRNA kieruje pozycjonowanie nukleosomów do loci na których zachodzi RdDM, najprawdopodobniej przez oddziaływanie z kompleksem SWI/SNF. W trzeciej pracy pokazaliśmy mechanizm i specyfikę wiązania AGO4 do chromatyny w skali całego genomu (Zheng et al., 2013). Ponieważ RdDM jest procesem działającym głównie na transpozonach, zakładano, że zaangażowane w ten proces białka wiążą się głównie do obszarów genomu z dużą ilością transpozonów. Nasza praca pokazała, że założenie to było całkowicie błędne. AGO4 nie tylko nie wykazuje preferencji wobec obszarów centromerowych, ale specyficznym wiąże się do promotorów genów kodujących białka. Ten wynik pokazał, że RdDM może mieć zupełnie inne znaczenie biologiczne niż do tej pory przypuszczano. Zamiast zapobiegać aktywizacji transpozonów może regulować ekspresję genów. Zgodnie z tą hipotezą szereg genów, których promotorów są miejscami wiązania AGO4, jest regulowanych przez lncRNA i AGO4. Pozostałe publikacje z ostatniego okresu to komentarz (Wierzbicki, 2010), artykuł przeglądowy (Wierzbicki, 2012) i artykuł opisujący wybrane stosowane przez nas metody (Rowley et al., 2013).

Podsumowując, na podstawie opisanych wyżej badań można zaproponować następujący model działania lncRNA w RdDM. Pol V produkuje lncRNA, który pozostaje przynajmniej przejściowo związany z polimerazą i stanowi miejsce wiązania dla szeregu białek odpowiedzialnych za modyfikację chromatyny. Spośród tych białek znamy AGO4 i SPT5L, które wspólnie tworzą warunki do wiązania metylotransferazy DNA oraz IDN2, który wiąże kompleks remodelujący chromatynę SWI/SNF. Kompleks ten pozycjonuje nukleosomy i kombinacja metylacji DNA ze

specyficznym pozycjonowaniem nukleosomów wycisza aktywność polimerazy RNA II. Mechanizm ten działa najczęściej na promotorach genów i wpływa na regulację ich ekspresji.

Obecnie pracujemy nad rozwinięciem tego modelu w dwóch kierunkach. Po pierwsze chcemy lepiej zrozumieć jak lncRNA kontroluje strukturę chromatyny (zarówno na poziomie nukleosomów jak i na poziomie organizacji chromosomów) oraz jak lncRNA i związane z nim białka kontrolują aktywność enzymów modyfikujących chromatynę. Po drugie chcemy zrozumieć jak produkcja lncRNA jest regulowana i w jakim stopniu regulacja niekodującej transkrypcji przyczynia się do regulacji aktywności genomu.

Alchembi.

Literatura

Ausin, I., Mockler, T.C., Chory, J., and Jacobsen, S.E. (2009). IDN1 and IDN2 are required for de novo DNA methylation in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *16*, 1325–1327.

Ausin, I., Greenberg, M.V.C., Simanshu, D.K., Hale, C.J., Vashisht, A.A., Simon, S.A., Lee, T.-F., Feng, S., Española, S.D., Meyers, B.C., et al. (2012). INVOLVED IN DE NOVO 2-containing complex involved in RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* *109*, 8374–8381.

Bies-Etheve, N., Pontier, D., Lahmy, S., Picart, C., Vega, D., Cooke, R., and Lagrange, T. (2009). RNA-directed DNA methylation requires an AGO4-interacting member of the SPT5 elongation factor family. *EMBO Rep.* *10*, 649–654.

Earley, K.W., Pontvianne, F., Wierzbicki, A.T., Blevins, T., Tucker, S., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2010). Mechanisms of HDA6-mediated rRNA gene silencing: suppression of intergenic Pol II transcription and differential effects on maintenance versus siRNA-directed cytosine methylation. *Genes Dev.* *24*, 1119–1132.

He, X.-J., Hsu, Y.-F., Zhu, S., Wierzbicki, A.T., Pontes, O., Pikaard, C.S., Liu, H.-L., Wang, C.-S., Jin, H., and Zhu, J.-K. (2009). An effector of RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis* is an ARGONAUTE 4- and RNA-binding protein. *Cell* *137*, 498–508.

- Herr, A.J., Jensen, M.B., Dalmay, T., and Baulcombe, D.C. (2005). RNA polymerase IV directs silencing of endogenous DNA. *Science* *308*, 118–120.
- Kanno, T., Huettel, B., Mette, M.F., Aufsatz, W., Jaligot, E., Daxinger, L., Kreil, D.P., Matzke, M., and Matzke, A.J.M. (2005). Atypical RNA polymerase subunits required for RNA-directed DNA methylation. *Nat. Genet.* *37*, 761–765.
- Kim, Y.J., Zheng, B., Yu, Y., Won, S.Y., Mo, B., and Chen, X. (2011). The role of Mediator in small and long noncoding RNA production in *Arabidopsis thaliana*. *EMBO J.* *30*, 814–822.
- Law, J.A., and Jacobsen, S.E. (2010). Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* *11*, 204–220.
- Onodera, Y., Haag, J.R., Ream, T., Costa Nunes, P., Pontes, O., and Pikaard, C.S. (2005). Plant nuclear RNA polymerase IV mediates siRNA and DNA methylation-dependent heterochromatin formation. *Cell* *120*, 613–622.
- Pikaard, C.S., Haag, J.R., Ream, T., and Wierzbicki, A.T. (2008). Roles of RNA polymerase IV in gene silencing. *Trends Plant Sci.* *13*, 390–397.
- Pontier, D., Yahubyan, G., Vega, D., Bulski, A., Saez-Vasquez, J., Hakimi, M.-A., Lerbs-Mache, S., Colot, V., and Lagrange, T. (2005). Reinforcement of silencing at transposons and highly repeated sequences requires the concerted action of two distinct RNA polymerases IV in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* *19*, 2030–2040.
- Przewłoka, M.R., Wierzbicki, A.T., Slusarczyk, J., Kuraś, M., Grasser, K.D., Stemmer, C., and Jerzmanowski, A. (2002). The “drought-inducible” histone H1s of tobacco play no role in male sterility linked to alterations in H1 variants. *Planta* *215*, 371–379.
- Ream, T.S., Haag, J.R., Wierzbicki, A.T., Nicora, C.D., Norbeck, A.D., Zhu, J.-K., Hagen, G., Guilfoyle, T.J., Pasa-Tolić, L., and Pikaard, C.S. (2009). Subunit compositions of the RNA-silencing enzymes Pol IV and Pol V reveal their origins as specialized forms of RNA polymerase II. *Mol. Cell* *33*, 192–203.

Rowley, M.J., Avrutsky, M.I., Sifuentes, C.J., Pereira, L., and Wierzbicki, A.T. (2011). Independent chromatin binding of ARGONAUTE4 and SPT5L/KTF1 mediates transcriptional gene silencing. *PLoS Genet.* 7, e1002120.

Rowley, M.J., Böhmendorfer, G., and Wierzbicki, A.T. (2013). Analysis of long non-coding RNAs produced by a specialized RNA polymerase in *Arabidopsis thaliana*. *Methods*.

Wierzbicki, A.T. (2010). Silencing: new faces of Morpheus' molecule. *EMBO J.* 29, 279–280.

Wierzbicki, A.T. (2012). The role of long non-coding RNA in transcriptional gene silencing. *Curr. Opin. Plant Biol.*

Wierzbicki, A.T., and Jerzmanowski, A. (2005). Suppression of histone H1 genes in *Arabidopsis* results in heritable developmental defects and stochastic changes in DNA methylation. *Genetics* 169, 997–1008.

Wierzbicki, A.T., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2008). Noncoding transcription by RNA polymerase Pol IVb/Pol V mediates transcriptional silencing of overlapping and adjacent genes. *Cell* 135, 635–648.

Wierzbicki, A.T., Ream, T.S., Haag, J.R., and Pikaard, C.S. (2009). RNA polymerase V transcription guides ARGONAUTE4 to chromatin. *Nat. Genet.* 41, 630–634.

Wierzbicki, A.T., Cocklin, R., Mayampurath, A., Lister, R., Rowley, M.J., Gregory, B.D., Ecker, J.R., Tang, H., and Pikaard, C.S. (2012). Spatial and functional relationships among Pol V-associated loci, Pol IV-dependent siRNAs, and cytosine methylation in the *Arabidopsis* epigenome. *Genes Dev.* 26, 1825–1836.

Xie, M., Ren, G., Costa-Nunes, P., Pontes, O., and Yu, B. (2012a). A subgroup of SGS3-like proteins act redundantly in RNA-directed DNA methylation. *Nucleic Acids Research* 40, 4422–4431.

Xie, M., Ren, G., Zhang, C., and Yu, B. (2012b). The DNA and RNA binding protein FACTOR OF DNA METHYLATION 1 requires XH domain-mediated complex formation for its function in RNA-directed DNA methylation. *The Plant Journal: For Cell and Molecular Biology*.

Zemach, A., Kim, M.Y., Hsieh, P.-H., Coleman-Derr, D., Eshed-Williams, L., Thao, K., Harmer, S.L., and Zilberman, D. (2013). The Arabidopsis nucleosome remodeler DDM1 allows DNA methyltransferases to access H1-containing heterochromatin. *Cell* 153, 193–205.

Zhang, C.-J., Ning, Y.-Q., Zhang, S.-W., Chen, Q., Shao, C.-R., Guo, Y.-W., Zhou, J.-X., Li, L., Chen, S., and He, X.-J. (2012). IDN2 and Its Paralogs Form a Complex Required for RNA-Directed DNA Methylation. *PLoS Genet.* 8, e1002693.

Zheng, B., Wang, Z., Li, S., Yu, B., Liu, J.-Y., and Chen, X. (2009). Intergenic transcription by RNA polymerase II coordinates Pol IV and Pol V in siRNA-directed transcriptional gene silencing in Arabidopsis. *Genes Dev.* 23, 2850–2860.

Zheng, Q., Rowley, M., Boehmdorfer, G., Sandhu, D., Gregory, B.D., and Wierzbicki, A.T. (2013). RNA Polymerase V targets transcriptional silencing components to promoters of protein-coding genes. *Plant Journal* 73, 179–189.

Zhong, X., Hale, C.J., Law, J.A., Johnson, L.M., Feng, S., Tu, A., and Jacobsen, S.E. (2012). DDR complex facilitates global association of RNA polymerase V to promoters and evolutionarily young transposons. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 19, 870–875.

Zhu, Y., Rowley, M., Boehmdorfer, G., and Wierzbicki, A.T. (2013). A SWI/SNF nucleosome remodeling complex acts in non-coding RNA-mediated transcriptional silencing. *Molecular Cell* 49, 298–309.