

Streszczenie

Astrocyty, będące komórkami gleju, są niezbędne dla poprawnego funkcjonowania mózgu, a zaburzenia w ich homeostazie są charakterystyczną cechą wielu zmian chorobowych. Ludzkie astrocyty wykazują unikalne cechy w porównaniu z ich mysimi i małpimi odpowiednikami. Tymi zmianami sterują ewolucyjne modyfikacje w sekwencji regionów regulatorowych DNA, zwłaszcza w tzw. wzmacniaczach („enhancerach”), które zwiększają ekspresję genów. Dokładna funkcjonalna rola poszczególnych zmian ewolucyjnych w elementach regulatorowych aktywnych w astrocytach pozostaje jednak nieznana.

Głównym celem mojej pracy doktorskiej było lepsze zrozumienie roli astrocytów w kształtowaniu cech charakterystycznych dla ludzkiego mózgu oraz ustalenie, czy i w jaki sposób ewolucyjne zmiany we wzmacniaczach mogły przyczynić się do specyficznej dla człowieka regulacji ekspresji genów w astrocytach, a co za tym idzie, do kształtowania się cech ludzkiego umysłu w toku ewolucji.

W pracy wykorzystano modele astrocytów otrzymane *in vitro* poprzez różnicowanie indukowanych pluripotentnych komórek macierzystych (ang. *induced pluripotent stem cells*, *iPSC*) pochodzących od człowieka, szympansa (*Pan troglodytes*) oraz makaka królewskiego (*Macaca mulatta*). Uzyskany w ten sposób model astrocytów *in vitro* (tzw. iAstrocyty) miał profil transkrypcyjny odpowiadającym astrocytom płodowym. W oparciu o ten model scharakteryzowano transkryptom, regulom i konformację chromatyny za pomocą technik omicznych: RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq i Intact Hi-C.

Na podstawie analizy ludzkich regionów regulatorowych w niniejszej pracy wykazałem, że warianty sekwencji związane z morfologią mózgu są istotnie wzbogacone w regionach genomowych posiadających sygnaturę aktywnych wzmacniaczy. Ponadto, zidentyfikowałem wzmacniacze aktywne w ludzkich astrocytach, których sekwencje ulegają wyjątkowo szybkim zmianom ewolucyjnym w porównaniu z innymi naczelnymi. Pokazałem również, że wzmacniacze specyficzne dla człowieka często zawierają warianty DNA odróżniające ludzi od hominidów. Wyniki te sugerują szersze wnioski na temat mechanizmów związanych z ewolucją mózgu i ludzkich zdolności poznawczych.

W dalszej części rozprawy, w celu identyfikacji funkcjonalnych elementów, zastosowałem wysokoprzepustowy test reporterowy (MPRA, *Massively Parallel Reporter Assay*). Do zbadania aktywności 10,241 unikatowych sekwencji DNA, które są potencjalnymi wzmacniaczami w iAstrocytach naczelnymi. Za pomocą MPRA oszacowałem wpływ mutacji w

sekwencjach rozpoznawanych przez wybrane czynniki transkrypcyjne oraz efekty wariantów wzmacniaczy związanych z cechami ludzkimi i chorobami.

W szczególności wykazałem, że obecność miejsc wiązania czynników transkrypcyjnych z rodziny USF (ang. *Universal Stripe Factors*) jest niezbędna dla aktywności wzmacniaczy zlokalizowanych w pobliżu genów wykazujących wyższą ekspresję w ludzkich iAstrocytach niż w iAstrocytach szympansa i makaka. Ponadto dowiodłem, że miejsca wiązania USF uległy niedawnym zmianom ewolucyjnym oraz opisałem powiązania między tymi zmianami a wariantami genetycznymi związanymi z chorobami.

Reasumując, badania przedstawione w niniejszej dysertacji pogłębiają nasze rozumienie roli astrocytów w rozwoju i ewolucji ludzkiego mózgu oraz dostarczają nowych informacji na temat mechanizmów regulacji genów, które mogły przyczynić się do powstania unikalnie ludzkich cech.

Abstract

Astrocytes, a type of glial cells, are essential for proper brain function, and disruptions in their homeostasis are a hallmark of numerous pathological conditions. Human astrocytes exhibit unique features compared to their mouse and primate counterparts, which are believed to be driven by alterations in the DNA sequences of regulatory regions, particularly enhancers, which increase gene expression. The precise functional contribution of individual evolutionary changes in regulatory elements active in astrocytes, however, remains unknown.

The main objective of my doctoral research was to gain a deeper understanding of the role of astrocytes in shaping the characteristics of the human brain and to determine whether, and how, evolutionary changes in enhancers may have contributed to uniquely human gene expression in astrocytes and, consequently, to the emergence of traits of the human mind during evolution.

In this work, I used astrocyte models generated *in vitro* through the differentiation of induced pluripotent stem cells (iPSCs) derived from humans, chimpanzees (*Pan troglodytes*), and rhesus macaques (*Macaca mulatta*). The resulting *in vitro* astrocyte model (so-called iAstrocytes) exhibited a transcriptional profile corresponding to fetal astrocytes. Based on this model, I characterized the transcriptome, regulome, and chromatin conformation using omics techniques including RNA-seq, ATAC-seq, ChIP-seq, and Intact Hi-C.

I demonstrated that sequence variants associated with brain morphology are significantly enriched in genomic regions that bear the signature of active enhancers. Moreover, I identified enhancers active in human astrocytes whose sequences undergo exceptionally rapid evolutionary changes compared to other primates. I also showed that human-specific enhancers frequently contain DNA variants that distinguish modern humans from archaic hominins. These results support broader conclusions regarding the mechanisms underlying brain evolution and human cognitive abilities.

In the subsequent part of the dissertation, to identify functional regulatory elements, I employed a high-throughput reporter assay (MPRA, Massively Parallel Reporter Assay) to measure the activity of 10,241 unique DNA sequences that represent potential enhancers in primate iAstrocytes. Using MPRA, I assessed the effects of mutations within sequences recognized by selected transcription factors, as well as the contributions of enhancer variants associated with human traits and diseases.

In particular, I demonstrated that the presence of binding sites for USF (Universal Stripe Factors) transcription factors is essential for the activity of enhancers located near genes with

higher expression in human iAstrocytes than in chimpanzee and macaque iAstrocytes. Furthermore, I showed that USF binding sites underwent recent evolutionary changes and described associations between these evolutionary modifications in the regulome and disease-linked genetic variants.

In summary, the studies presented in this dissertation deepen our understanding of the role of astrocytes in the development and evolution of the human brain and provide new insights into gene regulatory mechanisms that may have contributed to the emergence of uniquely human traits.