

STRESZCZENIE

CTCF to zachowane w toku ewolucji białko wiążące DNA, kluczowe dla regulacji trójwymiarowej architektury genomu. Wyznaczają granice domen powiązanych topologicznie (TAD, z ang. *topologically associated domain*) i reguluje interakcje między promotorami a wzmacniaczami. W komórkach ssaków wykazano, że lokalizacja miejsc wiązania CTCF (CBS, z ang. *CTCF binding sites*) pozostaje w dużej mierze niezmienna podczas różnicowania embrionalnych komórek macierzystych (ES, z ang. *embryonic stem cells*) do progenitorowych komórek pnia nerwowego (NS, z ang. *neural stem cells*), mimo wzrostu liczby i stabilności pętli chromatynowych. Zmiany architektury chromatyny w których uczestniczy CTCF mogą wpływać na regulację ekspresji genów. Nie jest jednak jasne, czy i w jaki sposób funkcje CTCF zmienia się w trakcie rozwoju.

Celem tej rozprawy doktorskiej było określenie roli białka CTCF w regulacji ekspresji genów podczas różnicowania komórek embrionalnych. W badaniach wykorzystano system degradowy CTCF umożliwiający kontrolowane i szybkie usunięcie białka CTCF w komórkach ES i NS. Następnie przeprowadzono profilowanie transkryptomów i regulomów w obu typach komórek. Wykazano, że utrata CTCF zmieniała ekspresję genów bez bezpośredniego wpływu na aktywność elementów regulatorowych. Geny o obniżonej ekspresji po usunięciu CTCF były wcześniej silnie ekspresjonowane i miały wiązanie CTCF w promotorze, natomiast geny o zwiększonej ekspresji cechowały się niskim poziomem transkrypcji i brakiem CTCF w promotorze. Dane te wspierają model, w którym w promotorach, CTCF wspomaga transkrypcję poprzez kontakt z odległymi wzmacniaczami, natomiast w regionach międzygenowych działa jako izolator.

Ponadto, wykazano, że mimo zachowanego wiązania z DNA, CTCF reguluje różne zestawy genów w komórkach ES i NS, co wskazuje na jego funkcje zależne od kontekstu epigenetycznego. Potwierdzono to edycją genomu w *locus Aldh1a3*. Dane proteomiczne otrzymane niezależnie w laboratorium, ujawniły zwiększoną interakcję CTCF z białkami wiążącymi RNA podczas różnicowania komórek ES do komórek NS. Komórki pozyskane w niniejszej pracy przyczyniły się do zidentyfikowania długiego niekodującego RNA (lncRNA, z ang. *non-long-coding RNA*) *Pantr1* jako mediatora tego procesu.

W ramach rozprawy opracowano wstępny projekt systemu wizualizacyjnego do obserwacji wybranych *loci* w żywych komórkach. To rozwiązanie to może stanowić podstawę do badania dynamiki interakcji między kotwicami pętli chromatyny w czasie rzeczywistym.

ABSTRACT

CTCF is a conserved DNA-binding protein that plays a key role in regulating the three-dimensional architecture of the genome. It defines the boundaries of topologically associated domains (TADs) and controls interactions between promoters and enhancers. In mammalian cells, the positions of CTCF-binding sites (CBS) have been shown to remain essentially unchanged during embryonic stem (ES) cell to neural stem (NS) cell differentiation, despite an increase in the number and stability of chromatin loops. Changes in chromatin architecture involving CTCF may influence its role in regulating gene expression. However, it remains unclear whether, and how, this regulatory function changes during development.

This doctoral thesis aimed to address this question and assess the functions of CTCF during the differentiation of ES cells into NS cells. To investigate this, a CTCF degron system enabling precise, inducible protein depletion was used, followed by transcriptome and regulome profiling in both cellular states. CTCF loss altered gene expression, but did not directly affect regulatory element activity. Genes downregulated upon CTCF depletion were highly expressed and contained CTCF binding at their promoters, whereas upregulated genes showed low basal expression and lacked promoter-bound CTCF. These findings support a model in which promoter-bound CTCF facilitates transcription by mediating contacts with distal enhancers, while intergenic CTCF acts as an insulator. The experiments outlined in this dissertation revealed that, despite stable DNA binding, CTCF regulates distinct gene sets in ES and NS cells, indicating cell-type-specific functions of this factor in development. This was further validated by genome editing at the *Aldh1a3* locus. To unveil what underlies the changes in CTCF functions in development, proteomic analysis was performed independently in the lab. These data revealed enhanced interactions between CTCF and RNA-binding proteins (RBP) in the NS compared to the ES cells. The cells derived in this work help identify long non-coding RNA (lncRNA) *Pantr1* as a mediator of the gain of CTCF-RBP interactions upon the ES-to-NS transition. In addition, a visualisation system was developed to monitor selected genomic *loci* in living cells, which has the potential, in the future, to enable real-time tracking of chromatin loop anchor dynamics.

In summary, although the localisation of CTCF binding sites remains stable during differentiation, its transcriptional regulatory function is dynamic and highly context-dependent.