

Dr Piotr A. Ziółkowski

Autoreferat

Określenie zależności pomiędzy rekombinacją genetyczną
a polimorfizmem DNA

Zakład Biotechnologii

Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii

Uniwersytet im. Adama Mickiewicza, Poznań

Department of Plant Sciences

University of Cambridge, UK

Cambridge 2015

1. Imię i nazwisko: Piotr Andrzej Ziółkowski

2. Dane kontaktowe: Department of Plant Sciences
University of Cambridge
Downing Street
Cambridge CB2 3EA
Wielka Brytania
tel. 01223 748966
e-mail: paz22@cam.ac.uk

3. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe:

2005r. Doktor nauk rolniczych w zakresie agronomii; Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu.

1999r. Magister inżynier biotechnologii; Akademia Rolnicza w Poznaniu (obecnie Uniwersytet Przyrodniczy)

4. Tytuł pracy doktorskiej, promotor, recenzenci:

Tytuł: Cytogenetyczna i bioinformatyczna charakterystyka zduplikowanych segmentów chromosomowych u wybranych gatunków z rodziny *Brassicaceae*

Promotor: prof. dr hab. Jan W. Sadowski (Instytut Genetyki Roślin PAN oraz Uniwersytet im. A. Mickiewicza)

Recenzenci: prof. dr hab. Jolanta Małuszyńska (Uniwersytet Śląski), prof. dr hab. Stanisław Cebrot (Uniwersytet Wrocławski)

5. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2011-obecnie	Postdoc (Postdoctoral research associate); Department of Plant Sciences, University of Cambridge, Cambridge, Wielka Brytania
2005-obecnie	Adiunkt; Zakład Biotechnologii, Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii, Uniwersytet im. A. Mickiewicza, Poznań (na urlopie bezpłatnym od 2011 roku)
2005	Adiunkt; Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań
1999-2004	Asystent; Pracownia Biologii Molekularnej, Instytut Genetyki Roślin, Polska Akademia Nauk, Poznań

6. Wskazanie osiągnięcia* wynikającego z art. 16 ust. 2 z dnia 14 marca 2003r. 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:

Określenie zależności pomiędzy rekombinacją genetyczną a polimorfizmem DNA

b) Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia naukowego

Osiągnięcie naukowe obejmuje cykl trzech prac, których sumaryczny IF wynosi **24,583**.

Ziolkowski P.A., Koczyk G., Galganski L., Sadowski J. (2009) Genome sequence comparison of Col and Ler lines reveals the dynamic nature of Arabidopsis chromosomes. *Nucleic Acids Research* 37: 3189-3201. doi: 10.1093/nar/gkp183. **IF 2009 = 7.479**

Yelina N.E. *, **Ziolkowski P.A. ***, Miller N., Zhao X., Kelly K.A., Muñoz D.F., Mann D.J., Copenhaver G.P., Henderson I.R. (2013) High-throughput analysis of meiotic crossover frequency and interference via flow cytometry of fluorescent pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Nature Protocols* 8: 2119-2134. doi: 10.1038/nprot.2013.131. **IF 2013 = 7.782 *podzielona pierwsza pozycja**

Ziolkowski P.A., Berchowitz L.E., Lambing C., Yelina N.E., Zhao X., Kelly K.A., Choi K., Ziolkowska L., June V., Sanchez-Moran E., Franklin C., Copenhaver G.P., Henderson I.R. (2015) Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during Arabidopsis meiosis. *Elife* 4. doi: 10.7554/eLife.03708. **IF 2014 = 9.322**

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

Różnorodność świata ożywionego bierze swoje źródło w ciągłych zmianach materiału genetycznego. Zmiany te powstają na dwa sposoby: poprzez spontaniczne mutacje DNA, które prowadzą do powstawania nowych wariantów sekwencji (tzw. polimorfizm genetyczny), albo też poprzez rekombinację genetyczną, która prowadzi do tworzenia nowych kombinacji tych wersji. W naturalnych populacjach organizmów istnieje równolegle szereg wariantów sekwencyjnych, alleli, dla niemal każdego locus, i praktycznie nieskończona liczba kombinacji allicznych, które będąc pod ciągłą presją selekcji i dryfu genetycznego, umożliwiają ewolucję gatunku.

W mojej pracy jestem w szczególności zainteresowany poznawaniem wzajemnych relacji pomiędzy polimorfizmem DNA a rekombinacją genetyczną. Chociaż polimorfizm sekwencji DNA powstaje zwykle w wyniku spontanicznych lub indukowanych mutagenami mutacji zmiany (substytucji) pojedynczego nukleotydu (SNP - *single nucleotide polymorphism*), to jednak w ostatnim czasie pojawia się coraz więcej przesłanek wskazujących na to, że czynnikiem mutagennym w przypadku SNP może być również rekombinacja mejozy (Arbeithuber et al., 2015). Z kolei pęknięcia dwuniciowe, które są naprawiane w oparciu o mechanizmy rekombinacyjne, mogą prowadzić do powstawania mutacji typu insercji-lub-delecji (indel). W naturze występuje kilka rodzajów rekombinacji, które mogą prowadzić do powstawania tego typu mutacji (Gaut et al., 2007).

Można zatem stwierdzić, że różne rodzaje rekombinacji odgrywają ważną rolę w tworzeniu polimorfizmu.

Z drugiej strony, obecność wersji polimorficznych DNA u jednego osobnika ma nie do końca zrozumiały wpływ na zachodzenie rekombinacji w mejozie. W tym ujęciu polimorfizm oznacza istnienie stanu heterozygotycznego pomiędzy rekombinującymi w mejozie chromosomami homologicznymi, w odróżnieniu od stanu homozygotycznego, gdy chromosomy, czy też regiony chromosomowe, są identyczne. Wcześniejsze badania pokazują, że rekombinacja mejotyczna jest wrażliwa na heterozygotyczność: polimorfizmy indel oraz SNP hamują zachodzenie mejotycznych crossover w skali hotspotów rekombinacyjnych (kpz) u grzybów, roślin i ssaków (Baudat and De Massy, 2007; Borts and Haber, 1987; Cole et al., 2010; Dooner, 1986; Jeffreys and Neumann, 2005). Pomimo tego, różnorodność sekwencji DNA i szacunki populacyjne chromosomowego rozkładu rekombinacji są ze sobą silnie pozytywnie skorelowane w wielu genomach roślinnych i zwierzęcych (Begun and Aquadro, 1992; Cutter and Payseur, 2013; Gore et al., 2009; Hellmann et al., 2003; Paape et al., 2012; Spencer et al., 2006). Ten pozorny paradoks nie jest do końca wyjaśniony. Pewne jest w każdym razie, że rozkład polimorfizmu (heterozygotyczności) wzdłuż chromosomu ma wpływ na rozkład crossover w mejozie.

W pierwszej pracy wchodzącej w skład osiągnięcia habilitacyjnego postanowiłem dowiedzieć się więcej na temat znaczenia różnych rodzajów rekombinacji w ewolucji genomów, w szczególności w kontekście powstawania polimorfizmu sekwencji DNA. Punktem wyjścia prowadzonych przeze mnie badań było porównanie całogenomowej sekwencji dwóch linii *A. thaliana*, Col-0 i Ler-0 (Ziolkowski et al., 2009). Wcześniejsze doniesienia oparte na technikach hybrydacyjnych (nowe techniki sekwencjonowania - NGS - nie były jeszcze w tamtym czasie rozpowszechnione) opisywały wysokie zróżnicowanie w chromosomowym rozkładzie polimorfizmów pojedynczych nukleotydów (Clark et al., 2007). W naszej pracy bazowaliśmy na udostępnionej przez firmę Monsanto Co. sekwencji genomu Ler-0 (Jander et al., 2002), którą porównaliśmy z referencyjnym genomem Col-0 (AGI 2000). Ze względu na zastosowanie w analizie kontigów Ler (ich średnia długość wynosiła 1,3 kpz), a nie krótkich sekwencji uzyskiwanych w NGS, możliwe było zidentyfikowanie 2201 dużych insercji-lub-delekcji (indel; >100pz) różnicujących obydwie linie.

Następnie poprzez zastosowanie analizy sekwencji miejsc otaczających poszczególne mutacje, określiłem prawdopodobne mechanizmy ich powstania. Stwierdziłem, że najczęstszym mechanizmem odpowiedzialnym za zachodzenie indeli jest rekombinacja nieuprawniona (*illegitimate recombination*), w wyniku której powstają stosunkowo krótkie delekcje. Pozostałe zidentyfikowane mechanizmy obejmowały rekombinację niewyrównaną (*unequal recombination*) oraz insercję/delekcję transpozonów. W dalszej kolejności prześledziłem częstość występowania mutacji indel w genach i odcinkach kodujących. Na tej podstawie stwierdziłem, że najważniejszym mechanizmem odpowiedzialnym za ewolucję strukturalną genów jest rekombinacja niewyrównana, zwłaszcza w odniesieniu do tworzenia rodzin genów powtórzonych tandemowo. Różne rodziny genów wykazywały różną podatność na modyfikacje strukturalne, w szczególności geny kodujące białka rybosomalne oraz czynniki transkrypcyjne były stosunkowo rzadko modyfikowane, natomiast geny odporności na choroby podlegały częstym zmianom typu indel. Wzór ten jest zbieżny z obserwacjami dotyczącymi udziału polimorfizmów SNP w ewolucji rodzin genowych (Clark et al., 2007).

Przeprowadzone w naszej pracy badania wykazały również, że rekombinacja niewyrównana jest istotna w usuwaniu sekwencji powtarzających zapobiegając w ten sposób ekspansji genomu. Przykładem takiego działania rekombinacji niewyrównanej jest wycinanie retrotranspozonów typu LTR (*Long Terminal Repeats*) - w toku tego procesu powstają stosunkowo łatwe do zidentyfikowania tzw. solo-LTR. Proces ten ma prawdopodobnie duże znaczenie w ewolucji genomów roślin uprawnych, zwłaszcza zbóż, gdzie transpozony LTR stanowią najliczniejszą grupę sekwencji powtarzających stanowiąc główną przyczynę olbrzymich rozmiarów ich genomów (Baidouri and Panaud, 2013). O ile rekombinacja niewyrównana generuje duże mutacje indel przyczyniając się do usuwania transpozonów, to rekombinacja nieuprawniona, która tworzy przede wszystkim krótkie delekcje, okazała się być istotnym mechanizmem ich unieczynniania. O znaczeniu obydwu mechanizmów w usuwaniu i inaktywacji transpozonów świadczy fakt, że oba typy mutacji dominują w regionach przycentromerowych, czyli tam, gdzie występuje znacząco podwyższona liczba transpozonów. Jednak dokładniejsza analiza tego rozkładu wykazała, że rekombinacja niewyrównana jest niewydajna w bezpośredniej bliskości centromerów, co jest zgodne z obniżoną częstością zachodzenia crossover w tych regionach (Choi et al., 2013) oraz wyższym poziomem metylacji DNA (Zhang et al., 2006). W regionach tych odnotowaliśmy natomiast zwiększoną liczbę indeli powstałych na skutek rekombinacji nieuprawnionej - może to świadczyć o tym, że mechanizm ten przejmuje rolę rekombinacji niewyrównanej w inaktywacji transpozonów w okolicach centromeru.

Powszechnie uważa się, że rekombinacja niewyrównana zachodzi w wyniku błędów przy powstawaniu crossover w mejozie (Kleckner, 1996). Zatem zdarzenia indel związane z tym typem rekombinacji powinny być przynajmniej w pewnym stopniu skorelowane z chromosomowym rozkładem rekombinacji. Po obliczeniu korelacji udało się potwierdzić tę zależność, co dostarcza dodatkowych przesłanek świadczących o roli rekombinacji mejotycznej w formowaniu polimorfizmu. Warto zauważyć, że inne typy indeli nie były skorelowane z rekombinacją mejotyczną.

Nasza praca z *Nucleic Acids Res.* (2009) była pierwszą, która nakreśliła obraz dużych indeli w ewolucji genomu *A. thaliana* uzupełniając w ten sposób naszą wiedzę na temat roli rekombinacji w powstawaniu polimorfizmu DNA. W dalszej części moich badań postanowiłem odwrócić ten problem badawczy i rzucić więcej światła na zagadnienie wpływu polimorfizmu na częstość i rozkład chromosomowy zdarzeń crossover (CO) w mejozie. Z różnych typów zdarzeń rekombinacyjnych wybrałem mejotyczne crossover, ponieważ odgrywają one najważniejszą rolę w funkcjonowaniu populacji eukariotycznych, a samo zagadnienie zależności polimorfizm *versus* crossover ma poważne implikacje praktyczne, szczególnie w hodowli roślin uprawnych. Mejotyczne crossover odpowiedzialne jest za tasowanie informacji genetycznej pochodzącej od obydwu rodziców, dzięki czemu dochodzi do powstawania nowych kombinacji alleli. Ponieważ w trakcie pojedynczej mejozy u większości eukariontów występuje 1-3 CO na jedną parę chromosomową (Mercier, 2014), zbadanie chromosomowego rozkładu i częstości CO jest zadaniem niełatwym. Tradycyjne metody oparte o analizy cytogenetyczne (liczenie chiazm) oraz na mapowaniu genetycznym są niewystarczające i niepraktyczne w sytuacji, gdy chcemy zbadać dużą liczbę różnych linii. Dlatego najpierw postanowiłem opracować nowe, wysokoprzepustowe metody pomiaru CO oparte na segregacji fluorescencyjnych reporterów (Francis et al., 2007; Melamed-Bessudo et al., 2005). Pierwszy wykorzystany w tym celu system oparty jest na markerach kodujących fluorescencyjne białka, które ulegają ekspresji w ziarnach pyłku (Francis et al., 2007). Linia reporterowa posiada dwa markery fluorescencyjne położone na tym samym chromosomie, w niewielkiej odległości od siebie. Po skrzyżowaniu z rośliną typu dzikiego powstają osobniki F_1 , u których podczas mejozy dochodzi do CO

pomiędzy chromosomami rodzicielskimi. W zależności od tego, czy CO zajdzie poza interwałem zdefiniowanym przez geny reporterowe, czy też w takim interwale, obserwujemy odpowiednio ziarna pyłku typu rodzicielskiego (niefluorescencyjne lub ekspresujące jednocześnie obydwa białka fluorescencyjne), bądź rekombinanty (z jednym białkiem fluorescencyjnym). Stosunek zrekombinowanych ziaren pyłku do całkowitej liczby ziaren pokazuje częstość rekombinacji w danym interwale. Jako że pojedyncza roślina wytwarza miliony ziaren pyłku, z których każde powstaje w wyniku mejozy, badanie dużej liczby ziaren dostarcza bardzo dokładnych i statystycznie istotnych szacunków rekombinacji.

Oryginalna metoda (Francis et al., 2007) opiera się na liczeniu pod mikroskopem fluorescencyjnym ziaren pyłku (w zasadzie tetrad) i jest w związku z tym bardzo czasochłonna. Opracowana przez nas metoda opiera się na wykorzystaniu cytometru przepływowego (Yelina & Ziolkowski et. al 2013). W rzeczy samej, prezentowana praca przedstawia dwa protokoły, jeden pozwalający na pomiar CO dla pojedynczego interwału, oraz drugi opierający się na pomiarze dwóch sąsiadujących ze sobą interwałów, zdefiniowanych przez trzy różne reportery fluorescencyjne. Moja rola polegała właśnie na opracowaniu drugiego protokołu, który poza jednoczesnym pomiarem częstości rekombinacji w dwóch interwałach pozwala także na zmierzenie interferencji genetycznej. Interferencja jest zjawiskiem nielosowego rozkładu zdarzeń CO wzdłuż chromosomów, które powoduje, że zajście CO w jednym miejscu na chromosomie inhibuje powstanie kolejnego CO w sąsiednich lokalizacjach. Zjawisko to jest bardzo słabo poznane ze względu na wyjątkową czasochłonność uzyskiwania danych - mierzenie interferencji wymaga analizy bardzo rzadkich zdarzeń podwójnego crossover (czyli sytuacji gdy CO zajdzie jednocześnie w dwóch sąsiadujących na chromosomie interwałach), a co za tym idzie analizy bardzo dużej liczby ziaren pyłku (ponad 12,5 tys. tetrad). Dlatego też opracowanie wysokoprzepustowej metody jest znacznym postępem technicznym w badaniach interferencji. Obliczyliśmy, że zastosowanie opracowanego przeze mnie protokołu pozwala na 150-krotne skrócenie czasu pomiaru, z 25 godzin do 10 minut.

Mierzenie częstości CO w oparciu o fluorescencyjny pyłek ma jednak kilka ograniczeń technicznych. Po pierwsze, analizę trzeba przeprowadzić w trakcie kwitnienia roślin, gdyż pyłek nie nadaje się do przechowywania. Jest to poważne utrudnienie w sytuacji, kiedy pomiarów dokonuje się w dużych populacjach. Po drugie, jeśli pomiary mają być prowadzone w kolejnych pokoleniach, nie ma możliwości selekcji nasion w taki sposób, by były one heterozygotyczne dla reporterów (co jest wymogiem pomiaru rekombinacji), w związku z czym ponad połowa wysianych nasion nie będzie nadawać się do analiz. Aby ominąć obydwa ograniczenia, opracowałem wysokoprzepustową metodę opartą na wcześniej rozwiniętym systemie fluorescencyjnych nasion (Melamed-Bessudo et al., 2005) i została ona włączona do pracy opublikowanej w *eLife* (Ziolkowski et al., 2015). Opracowana przeze mnie metoda jest obecnie szeroko stosowana w pracach zespołu dr Iana Hendersona (University of Cambridge), i jest wykorzystywana zarówno w kilku równoległych projektach mapowania QTL dla modyfikatorów rekombinacji, jak i w prowadzonym w zespole badaniu przesiewowym (*forward genetic screen*) mutantów rekombinacyjnych. Od niedawna dostępnych jest już kilkadziesiąt różnych linii reporterowych w systemie fluorescencyjnych nasion, które pozwalają na pomiar rekombinacji w dowolnym regionie chromosomowym (Wu et al., 2015).

Opracowanie wysokoprzepustowych metod pomiaru częstości CO pozwoliło na przeprowadzenie szeroko zakrojonej charakterystyki efektów polimorfizmu DNA na chromosomowy rozkład rekombinacji mejotycznej. W pierwszej fazie tego projektu postanowiliśmy opisać zmienność w

częstości CO u *A. thaliana*. W tym celu skrzyżowałem 32 różne linie Arabidopsis z pięcioma liniami reporterowymi, pozwalającymi na pomiar częstości CO w interwałach o odmiennej lokalizacji chromosomowej. Pomiarów dokonywałem w pokoleniu F₁. Warto podkreślić fakt, że w toku tej analizy zbadałem łącznie bezprecedensową liczbę 13,264,943 mejoz. Na tej podstawie stwierdziłem, że Arabidopsis charakteryzuje się dużym zróżnicowaniem w częstości crossover, zwłaszcza w interwałach przytelomerowych i okołowcentromerowych. Co więcej, wiele uzyskanych heterozygotycznych krzyżówek dawało rośliny wykazujące wyższe lub niższe wartości CO niż kontrolne krzyżówki homozygotyczne Col x Col. Sugeruje to, że polimorfizm niekoniecznie ma inhibujący wpływ na crossover, choć w przypadku roślin pokolenia F₁ na częstość rekombinacji wpływ mają zarówno efekty polimorfizmu działające w układzie *cis* (polimorfizm sekwencji na chromosomie, na którym zlokalizowany jest dany interwał pomiarowy), jak i *trans* (polimorfizm genów kontrolujących zachodzenie crossover).

Następnie używając populacji rekombinantów zaobserwowałem, że regiony heterozygotyczne wykazują wzrost częstości rekombinacji, gdy sąsiadują z regionami homozygotycznymi na tym samym chromosomie. Efekt ten jest zupełnie nieoczekiwany i sprzeczny z powszechnie akceptowanym paradygmatem mówiącym o tym, że stan heterozygotyczności działa inhibująco na CO (Baudat and De Massy, 2007; Borts and Haber, 1987; Cole et al., 2010; Dooner, 1986; Jeffreys and Neumann, 2005). Dalsza analiza oparta o dodatkowe populacje F₂ pokazała, że zaobserwowany efekt jest uniwersalny, niezależny od chromosomu, ani lokalizacji chromosomowej. Co więcej, w eksperymencie z dwoma sąsiadującymi interwałami, z których jeden był homozygotyczny, a drugi heterozygotyczny pokazałem, że wzrost częstości crossover w regionie heterozygotycznym odbywa się przy jednoczesnym spadku częstości w sąsiadującym regionie homozygotycznym. Zależność ta wskazywała na zaangażowanie interferencji genetycznej w cały proces, ponieważ to właśnie interferencja jest mechanizmem pozwalającym na kontrolowanie dystrybucji crossover wzdłuż chromosomu. W związku z tym w dalszej analizie przestudiowałem mutanty interferencyjne *fancm*, *zip4* oraz podwójnego mutantu *fancm zip4*. U Arabidopsis, podobnie jak u zdecydowanej większości eukariontów, występują dwa szlaki crossover: szlak zależny od interferencji, który jest odpowiedzialny za powstawanie ok. 85% wszystkich zdarzeń CO u *A. thaliana*, oraz szlak niezależny od interferencji, który przyczynia się do tworzenia pozostałych 15% crossover (Berchowitz et al., 2007; Mercier et al., 2005). W mutancie *zip4* pierwszy z tych szlaków jest całkowicie wyłączony (Chelysheva et al., 2007). Z kolei w mutancie *fancm* obserwuje się drastyczny wzrost aktywności szlaku niezależnego od interferencji, na skutek inaktywacji białka *FANCM* będącego represorem tego szlaku (Crismani et al., 2012; Knoll et al., 2012). W związku z powyższym, porównanie rekombinacji pomiędzy typem dzikim a mutantami *fancm*, *zip4* oraz *fancm zip4* pozwoliło mi na gruntowne przestudiowanie wpływu polimorfizmu (różne kombinacje regionów hetero- i homozygotycznych) na zachodzenie crossover w obydwóch szlakach rekombinacyjnych. Opisany przez nas "Juxtaposition efekt" zanikał pod nieobecność interferencji, co potwierdziło zaangażowanie tego zjawiska w powstawanie efektu. Co więcej, zaobserwowaliśmy że przy nieaktywności szlaku crossover zależnego od interferencji poboczny szlak tworzenia CO, który jest niezależny od interferencji, praktycznie nie był zdolny do rekombinacji w regionach heterozygotycznych, nawet w stymulującym tę ścieżkę tle genetycznym mutantu *fancm*. Niesie to poważne implikacje dla zastosowania mutantów interferencyjnych, zwłaszcza mutantu *fancm* (Crismani et al., 2012), w hodowli roślin. W pracy przedstawiliśmy również dwa modele wyjaśniające w jaki sposób dochodzi do "Juxtaposition efekt", ich potwierdzenie wymaga jednak przeprowadzenia dalszych badań.

Innym dokonaniem przeze mnie odkryciem zaprezentowanym w publikacji w *eLife* było stwierdzenie, że w stanie heterozygotycznym w roślinach typu dzikiego dochodzi do znacznego wzrostu siły interferencji crossover. Odkrycie to jest zupełnie nieoczekiwane, ponieważ do zwiększenia interferencji niemal zawsze dochodzi przy jednoczesnym wzroście częstości rekombinacji, a w tym przypadku (w roślinach pokolenia F₁) takiego efektu nie obserwowano. Wy tłumaczeniem tego fenomenu może być istnienie niedawno odkrytego sprzężenia zwrotnego przy powstawaniu pęknięć dwuniciowych (Carballo et al., 2008; Lange et al., 2011), które są wstępnym etapem formowania crossover.

Warto zwrócić uwagę, że nasza praca jest pierwszą nie tylko u roślin, ale w ogóle pracą, w której analizowana jest interferencja genetyczna w kontekście polimorfizmu genetycznego. Jest także pierwszą pracą w której rozpatruje się przemodelowanie rozkładu crossover w odniesieniu do układu regionów heterozygotycznych i homozygotycznych wzdłuż chromosomu. Zagadnienie to jest nie tylko interesujące z naukowego punktu widzenia, ale także ważne ze względu na potencjalne zastosowanie w nowoczesnej hodowli roślin. W przypadku wielu gatunków uprawnych bowiem czynnikiem znacząco utrudniającym wyprowadzanie nowych odmian jest brak crossover w niektórych regionach chromosomowych, co uniemożliwia transgresję ważnych z użytkowego punktu widzenia genów, np. odporności na choroby. Znajomość praw odpowiedzialnych za rozkład crossover oraz wpływ polimorfizmu na ten proces mogą znacząco przyspieszyć postęp hodowlany poprzez umiejętne dobieranie genotypów do krzyżówek. Co więcej, "Juxtaposition effect" jest naturalnym zjawiskiem, nie wymaga zatem zastosowania nieakceptowalnych jak dotąd w Europie roślin transgenicznych.

Podsumowując, przedstawione przeze mnie do oceny badania rzucają nowe światło na zjawiska powstawania polimorfizmu genetycznego przy udziale mechanizmów rekombinacyjnych, oraz na wpływ tegoż polimorfizmu na chromosomowy rozkład rekombinacji w mejozie. W pracach tych wykazałem, że 1) różne rodzaje rekombinacji genetycznej mogą prowadzić do powstawania polimorfizmów indel, 2) rekombinacja niewyrównana odgrywa kluczową rolę w ewolucji genów, zwłaszcza tworzeniu rodzin genów powtórzonych tandemowo, 3) rekombinacja nieuprawniona przyczynia się do unieczynniania transpozonów, 4) rekombinacja niewyrównana jest również istotna w usuwaniu sekwencji powtarzalnych, 5) cytometria przepływowa może być wykorzystana do pomiarów częstości rekombinacji i interferencji DNA w liniach reporterowych, 6) obecność polimorfizmu ma bezpośredni wpływ na częstość zachodzenia rekombinacji w mejozie, 7) w typie dzikim, regiony polimorficzne (heterozygotyczne) wykazują wzrost częstości crossover przy równoczesnym spadku częstości crossover w sąsiadujących na chromosomie regionach niepolimorficznych (homozygotycznych), 8) efekt ten jest wywołany przez ścieżkę rekombinacji zależną od interferencji, 9) dwa szlaki rekombinacyjne wykazują odmienną wrażliwość na polimorfizm, 10) polimorfizm DNA bezpośrednio wpływa na wzrost siły interferencji genetycznej.

7. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

Główny nurt mojej pracy naukowo-badawczej do doktoratu dotyczył badań związanych z ewolucją strukturalną genomów roślinnych w rodzinie Brassicaceae. Znaczącą rolę w tych badaniach odgrywała technika fluorescencyjnej hybrydyzacji *in situ* (FISH). W pierwszym okresie zajmowałem się charakterystyką loci kodujących rybosomalne RNA w rodzaju *Brassica*. Aby zwiększyć rozdzielczość mapowania koncentrowałem się na stadium pachytenu mejozy I. Pozwoliło to na

odkrycie nowego locus 5S rDNA u *Brassica oleracea* oraz opisanie związanego z nim polimorfizmu strukturalnego (Ziolkowski and Sadowski, 2002). Co ważniejsze, zastosowanie biwalentów pachytenowych umożliwiło mi skuteczne zmapowanie sekwencji unikalnych pochodzących z *A. thaliana* w genomie *B. oleracea*. Warto podkreślić, że była to pierwsza praca, w której zastosowano hybrydyzację heterologiczną sekwencji unikalnych przy wykorzystaniu klonów BAC (sztucznych chromosomów bakteryjnych) do chromosomów w stadium pachytenu.

Zastosowane przeze mnie podejście badawcze z wykorzystaniem stadium pachytenu było w późniejszym czasie szeroko stosowane przez inne zespoły pracujące nad porównywaniem struktury genomów roślinnych i przyczyniło się do powstania technik określanych jako "malowanie chromosomów" u roślin (Lysak et al., 2006, 2005; Mandáková and Lysak, 2008). Również moje badania były skoncentrowane na rozwijaniu tego kierunku badawczego. W szczególności interesowało mnie zagadnienie wtórnej diploidyzacji genomów Brassicaceae po przejściu przez duplikację całogenomową 24-40 mln lat temu (Blanc et al., 2003). W pracy w *Plant Journal*, którą opublikowałem już po zakończeniu doktoratu, przy wykorzystaniu takiego samego podejścia lecz w znacznie większej skali (95 klonów BAC) badałem zachowawczość strukturalną dawnych chromosomowych miejsc rearanżacji pomiędzy *Arabidopsis* i *Brassica* (Ziolkowski et al., 2006). Badania nasze udowodniły, że większość rearanżacji strukturalnych, które zaszły w procesie wtórnej diploidyzacji przodków Brassicaceae, miało miejsce jeszcze przed rozejściem się obu linii ewolucyjnych. Jednocześnie odkryliśmy, że jedno z analizowanych miejsc rekombinacyjnych nie jest zachowane w jednej z trzech kopii powstałych na skutek późniejszej tryplikacji genomu przodka *Brassica*. Wskazuje to, że trzy genomy, które utworzyły współczesny genom *Brassica*, nie były jednorodne pod względem strukturalnym. W oparciu o te wyniki zaproponowaliśmy nowy model ewolucji rodzaju *Brassica*, który zakłada utworzenie heksaploidalnego przodka na drodze hybrydyzacji genomu tetraploidalnego i diploidalnego (Ziolkowski et al., 2006).

Równoległe do badań porównawczych opartych o BAC/FISH i mapowanie genetyczne, zajmowałem się bioinformatyczną analizą sekwencji genomu *A. thaliana*. Ten wątek badawczy rozpoczął się wraz z miesięcznym stażem, który odbyłem na Uniwersytecie w Perpignan (Francja), w zespole który jako pierwszy odkrył dawną duplikację genomu przodka *Arabidopsis* (Blanc et al., 2000). Prowadzone przeze mnie badania zidentyfikowały dodatkowe rundy poliploidyzacyjne, jakie miały miejsce w trakcie ewolucji genomu *Arabidopsis* (Ziolkowski et al., 2003). Co więcej, zidentyfikowaliśmy również szereg rearanżacji strukturalnych, które doprowadziły do dywergencji strukturalnej zduplikowanych regionów chromosomowych. Opisaliśmy również zjawiska takie jak ekspansja rodzin genów powtórzonych tandemowo czy utrata genów (*gene loss*). Na podstawie tych analiz zaproponowaliśmy przebieg ewolucji strukturalnej czterech segmentów chromosomowych o wspólnym pochodzeniu (Ziolkowski et al., 2003). Prace z zakresu ewolucji genomów w rodzinie Brassicaceae poza publikacjami oryginalnymi zaowocowały również przygotowaniem kilku pozycji o charakterze przeglądowym (monograficzne rozdziały w angielskojęzycznych publikacjach książkowych); w jednej z nich występowałem jako autor korespondencyjny.

W roku 2008 odbyłem 4-miesięczny staż na Uniwersytecie w Manchesterze, gdzie zapoznałem się z techniką immunoprecypitacji chromatyny (ChIP - *chromatin immunoprecipitation*) i zainteresowałem zagadnieniami związanymi z epigenetyką. Po powrocie do kraju rozwijałem ten kierunek badawczy kierując grantem, w którym charakteryzujemy znaczenie wariantu histonowego H2A.Z w regulacji ekspresji genów w stresie suszy. Ten moment można uznać za początek tworzenia grupy badawczej

pod moim kierunkiem, złożonej z kilku studentów wykonujących prace licencjackie i magisterskie (obecnie dwójka z nich kontynuuje karierę naukową w charakterze słuchaczy studium doktoranckiego na UAM, jestem promotorem pomocniczym w obydwu przewodach). W temacie epigenetycznym przeprowadziliśmy eksperymenty wielkoskalowe CHIP-seq, MNase-seq i RNA-seq, pokazujące specyficzne wycofywanie wariantu histonowego H2A.Z z genów podczas indukcji transkrypcji w warunkach stresowych. Obecnie finalizujemy prace nad publikacjami z tego zakresu. Badania nad histonem H2A.Z w pewnym stopniu kontynuowałem również w pierwszym okresie mojego stażu na Uniwersytecie w Cambridge, gdzie we współpracy z grupą Iana Hendersona opisaliśmy jego znaczenie w rekombinacji mejotycznej (Choi et al., 2013). Równolegle z charakterystyką roli wariantu H2A.Z wraz z moimi studentami rozpocząłem badania nad charakteryzacją kompleksów remodelujących chromatynę, w szczególności kompleksów SWR1 i NuA4. Prace te zaowocowały odkryciem nowych podjednostek kompleksu acetylazy histonowej NuA4 u *A. thaliana*, z których jedną, *AtEAF1*, opisaliśmy niedawno w publikacji (Bieluszewski et al., 2015). W pracy tej, wraz z prof. Janem Sadowskim, występuję jako autor korespondencyjny.

Ponadto nadal kontynuuję badania na Uniwersytecie w Cambridge związane z rekombinacją mejotyczną, interesując się w szczególności naturalną zmiennością genetyczną. W ramach realizowanego przeze mnie projektu przeprowadziłem mapowanie QTL (*Quantitative Trait Loci*) i zidentyfikowałem dwa loci odpowiedzialne za większość zmienności w częstości crossover u *A. thaliana*. W przypadku jednego z QTL wraz z kolegą Charlesem Underwoodem ostatecznie zidentyfikowaliśmy odpowiedzialny gen, i udowodniliśmy że jest on czynnikiem limitującym częstość crossover u *Arabidopsis*: transformacje linii dzikiej *A. thaliana* pokazały, że dodatkowe kopie tego genu prowadzą do znaczącego wzrostu częstości crossover. Warto podkreślić, że jest to pierwszy zmapowany QTL u roślin kontrolujący częstość rekombinacji mejotycznej. Ze względu na fakt, że zwiększenie liczby crossover jest bardzo pożądane w hodowli roślin, zwłaszcza zbóż, dalsza część projektu obejmuje transformację odpowiednimi konstrukcjami genetycznymi pszenicy oraz kukurydzy. Złożyliśmy również zgłoszenie patentowe dotyczące wykorzystania tego genu w hodowli roślin.

W trakcie mojej kariery naukowej uczestniczyłem w realizacji kilkunastu grantów badawczych MNiSW, NCN, NCBiR oraz dwóch grantów finansowanych przez EU (patrz załącznik nr 4). W czterech z tych projektów funkcjonowałem jako główny wykonawca, bądź kierownik. Projekt związany z charakterystyką roli wariantu histonowego H2A.Z w odpowiedzi na stres suszy pozwolił mi na utworzenie własnej grupy badawczej. Natomiast dzięki projektowi *Mobilność Plus* mogłem odbyć kilkuletni staż na Uniwersytecie w Cambridge.

Warto podkreślić fakt, że moje osiągnięcia naukowe kilkakrotnie były wyróżniane nagrodami o zasięgu krajowym. Do najważniejszych z nich należą Nagroda im. Stefana Barbackiego I-stopnia z zakresu genetyki roślin za „Badania nad poznaniem struktury i organizacji genomów w rodzinie Brassicaceae” (2003), oraz dwukrotnie Nagroda za najlepszą publikację z zakresu genetyki (w roku 2007 i 2010) przyznawana przez Polskie Towarzystwo Genetyczne. Nagroda PTG z 2010 roku została przyznana za publikację z *Nucleic Acids Res.* wchodzącą w skład przedstawionego osiągnięcia habilitacyjnego (Ziolkowski et al., 2009).

Arbeithuber, B., Betancourt, A.J., Ebner, T., and Tiemann-Boege, I. (2015). Crossovers are associated with mutation and biased gene conversion at recombination hotspots. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *112*, 201416622.

Baidouri, M. El, and Panaud, O. (2013). Comparative genomic paleontology across plant kingdom reveals the dynamics of TE-driven genome evolution. *Genome Biol. Evol.* *5*, 954–965.

Baudat, F., and De Massy, B. (2007). Cis- and Trans-Acting Elements Regulate the Mouse Psmb9 Meiotic Recombination Hotspot. *PLoS Genet.* *3*, 11.

Begun, D.J., and Aquadro, C.F. (1992). Levels of naturally occurring DNA polymorphism correlate with recombination rates in *D. melanogaster*. *Nature* *356*, 519–520.

Berchowitz, L.E., Francis, K.E., Bey, A.L., and Copenhaver, G.P. (2007). The role of AtMUS81 in interference-insensitive crossovers in *A. thaliana*. *PLoS Genet.* *3*, e132.

Bieluszewski, T., Galganski, L., Sura, W., Bieluszewska, A., Abram, M., Ludwikow, A., Ziolkowski, P.A., and Sadowski, J. (2015). AtEAF1 is a potential platform protein for Arabidopsis NuA4 acetyltransferase complex. *BMC Plant Biol.* *15*, 1–15.

Blanc, G., Barakat, a, Guyot, R., Cooke, R., and Delseny, M. (2000). Extensive duplication and reshuffling in the Arabidopsis genome. *Plant Cell* *12*, 1093–1101.

Blanc, G., Hokamp, K., and Wolfe, K.H. (2003). A recent polyploidy superimposed on older large-scale duplications in the Arabidopsis genome. *Genome Res.* *13*, 137–144.

Borts, R.H., and Haber, J.E. (1987). Meiotic recombination in yeast: alteration by multiple heterozygosities. *Science* (80-.). *237*, 1459–1465.

Carballo, J. a., Johnson, A.L., Sedgwick, S.G., and Cha, R.S. (2008). Phosphorylation of the Axial Element Protein Hop1 by Mec1/Tel1 Ensures Meiotic Interhomolog Recombination. *Cell* *132*, 758–770.

Chelysheva, L., Gendrot, G., Vezon, D., Doutriaux, M.-P., Mercier, R., and Grelon, M. (2007). Zip4/Spo22 is required for class I CO formation but not for synapsis completion in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.* *3*, e83.

Choi, K., Zhao, X., Kelly, K. a, Venn, O., Higgins, J.D., Yelina, N.E., Hardcastle, T.J., Ziolkowski, P. a, Copenhaver, G.P., Franklin, F.C.H., et al. (2013). Arabidopsis meiotic crossover hot spots overlap with H2A.Z nucleosomes at gene promoters. *Nat. Genet.*

Clark, R.M., Schweikert, G., Toomajian, C., Ossowski, S., Zeller, G., Shinn, P., Warthmann, N., Hu, T.T., Fu, G., Hinds, D.A., et al. (2007). Common sequence polymorphisms shaping genetic diversity in Arabidopsis thaliana. *Science* *317*, 338–342.

Cole, F., Keeney, S., and Jasin, M. (2010). Comprehensive, fine-scale dissection of homologous recombination outcomes at a hot spot in mouse meiosis. *Mol. Cell* *39*, 700–710.

Crismani, W., Girard, C., Froger, N., Pradillo, M., Santos, J.L., Chelysheva, L., Copenhaver, G.P., Horlow, C., and Mercier, R. (2012). FANCM limits meiotic crossovers. *Science* *336*, 1588–1590.

Cutter, A.D., and Payseur, B. a (2013). Genomic signatures of selection at linked sites: unifying the disparity among species. *Nat. Rev. Genet.* *14*, 262–274.

Dooner, H.K. (1986). Genetic Fine Structure of the BRONZE Locus in Maize. *Genetics* *113*, 1021–1036.

Francis, K.E., Lam, S.Y., Harrison, B.D., Bey, A.L., Berchowitz, L.E., and Copenhaver, G.P. (2007). Pollen tetrad-based visual assay for meiotic recombination in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *104*, 3913–3918.

Gaut, B.S., Wright, S.I., Rizzon, C., Dvorak, J., and Anderson, L.K. (2007). Recombination: an underappreciated factor in the evolution of plant genomes. *Nat. Rev. Genet.* *8*, 77–84.

Gore, M.A., Chia, J.-M., Elshire, R.J., Sun, Q., Ersoz, E.S., Hurwitz, B.L., Peiffer, J.A., McMullen, M.D., Grills, G.S., Ross-Ibarra, J., et al. (2009). A first-generation haplotype map of maize. *Science* *326*, 1115–1117.

Hellmann, I., Ebersberger, I., Ptak, S.E., Pääbo, S., and Przeworski, M. (2003). A neutral explanation for the correlation of diversity with recombination rates in humans. *Am. J. Hum. Genet.* *72*, 1527–1535.

Jander, G., Norris, S.R., Rounsley, S.D., Bush, D.F., Levin, I.M., Last, R.L., Llc, C.G., and Street, S. (2002). Arabidopsis Map-Based Cloning in the Post-Genome Era. *Plant Physiol.* *129*, 440–450.

- Lysak, M. a, Berr, A., Pecinka, A., Schmidt, R., McBreen, K., and Schubert, I. (2006). Mechanisms of chromosome number reduction in *Arabidopsis thaliana* and related Brassicaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 5224–5229.
- Lysak, M. a., Koch, M. a., Pecinka, A., and Schubert, I. (2005). Chromosome triplication found across the tribe Brassicaceae. *Genome Res.* *15*, 516–525.
- Mandáková, T., and Lysak, M. a (2008). Chromosomal phylogeny and karyotype evolution in $x=7$ crucifer species (Brassicaceae). *Plant Cell* *20*, 2559–2570.
- Melamed-Bessudo, C., Yehuda, E., Stuitje, A.R., and Levy, A. a (2005). A new seed-based assay for meiotic recombination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *43*, 458–466.
- Mercier, R. (2014). The Molecular Biology of Meiosis in Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *66*, 1–31.
- Mercier, R., Jolivet, S., Vezon, D., Huppe, E., Chelysheva, L., Giovanni, M., Nogué, F., Doutriaux, M.-P., Horlow, C., Grelon, M., et al. (2005). Two meiotic crossover classes cohabit in *Arabidopsis*: one is dependent on MER3, whereas the other one is not. *Curr. Biol.* *15*, 692–701.
- Paape, T., Zhou, P., Branca, A., Briskine, R., Young, N., and Tiffin, P. (2012). Fine-scale population recombination rates, hotspots, and correlates of recombination in the *Medicago truncatula* genome. *Genome Biol. Evol.* *4*, 726–737.
- Spencer, C.C. a, Deloukas, P., Hunt, S., Mullikin, J., Myers, S., Silverman, B., Donnelly, P., Bentley, D., and McVean, G. (2006). The influence of recombination on human genetic diversity. *PLoS Genet.* *2*, e148.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative (2000). Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* *408*, 796–815.
- Wu, G., Rossivito, G., Hu, T., Berlyand, Y., and Poethig, R.S. (2015). Traffic Lines: New Tools for Genetic Analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Genet.* *200*, 35–45.
- Yelina, N.E., Ziolkowski, P. a, Miller, N., Zhao, X., Kelly, K. a, Muñoz, D.F., Mann, D.J., Copenhaver, G.P., and Henderson, I.R. (2013). High-throughput analysis of meiotic crossover frequency and interference via flow cytometry of fluorescent pollen in *Arabidopsis thaliana*. *Nat. Protoc.* *8*, 2119–2134.
- Zhang, X., Yazaki, J., Sundaresan, A., Cokus, S., Chan, S.W.L., Chen, H., Henderson, I.R., Shinn, P., Pellegrini, M., Jacobsen, S.E., et al. (2006). Genome-wide High-Resolution Mapping and Functional Analysis of DNA Methylation in *Arabidopsis*. *Cell* *126*, 1189–1201.
- Ziolkowski, P. a, and Sadowski, J. (2002). FISH-mapping of rDNAs and *Arabidopsis* BACs on pachytene complements of selected Brassicas. *Genome* *45*, 189–197.
- Ziolkowski, P. a, Berchowitz, L.E., Lambing, C., Yelina, N.E., Zhao, X., Kelly, K. a, Choi, K., Ziolkowska, L., June, V., Sanchez-Moran, E., et al. (2015). Juxtaposition of heterozygous and homozygous regions causes reciprocal crossover remodelling via interference during *Arabidopsis* meiosis. *Elife* *4*, 1–29.
- Ziolkowski, P. a., Blanc, G., and Sadowski, J. (2003). Structural divergence of chromosomal segments that arose from successive duplication events in the *Arabidopsis* genome. *Nucleic Acids Res.* *31*, 1339–1350.
- Ziolkowski, P. a., Kaczmarek, M., Babula, D., and Sadowski, J. (2006). Genome evolution in *Arabidopsis*/Brassica: Conservation and divergence of ancient rearranged segments and their breakpoints. *Plant J.* *47*, 63–74.
- Ziolkowski, P. a., Koczyk, G., Galganski, L., and Sadowski, J. (2009). Genome sequence comparison of Col and Ler lines reveals the dynamic nature of *Arabidopsis* chromosomes. *Nucleic Acids Res.* *37*, 3189–3201.