

Charakterystyka źródeł zmienności genów odpowiedzialnych za metabolizm wtórny grzybów wyższych poprzez analizy z zakresu genomiki ewolucyjnej oraz rekonstrukcje filogenetyczne historii zakonserwowanych domen białkowych

AUTOREFERAT OSIĄGNIĘCIA


dr Grzegorz Koczyk

27 czerwca 2018 r.

1. Imię i nazwisko Grzegorz Koczyk

2. Posiadane dyplomy, stopnie naukowe

18/01/2008 – stopień **doktora nauk biologicznych** w zakresie **biologii – biologii molekularnej** nadany uchwałą Rady Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza na podstawie przedstawionej rozprawy doktorskiej pt. “Adnotacja funkcjonalna genów z wykorzystaniem profilowych metod analizy sekwencji” (promotor: prof. dr hab. Jerzy Chełkowski, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk)

18/10/2002 - tytuł **magistra biologii** w zakresie **biologii molekularnej** nadany przez Wydział Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza na podstawie pracy magisterskiej pt. “Computational aspects of phylogenetic analysis: In search of paralogs” (promotor: prof. dr hab. Jacek Błazewicz, Politechnika Poznańska)

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

2008-teraz – adiunkt, Zakład Biometrii i Bioinformatyki, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań

2003-2007 – student studium doktoranckiego Wydziału Biologii Uniwersytetu Adama Mickiewicza w Poznaniu (praca doktorska realizowana w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk, Poznań)

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. 2016 r. poz. 882 ze zm. w Dz. U. z 2016 r. poz. 1311)

A. Tytuł osiągnięcia “Charakterystyka źródeł zmienności genów odpowiedzialnych za metabolizm wtórny grzybów wyższych poprzez analizy z zakresu genomiki ewolucyjnej oraz rekonstrukcje filogenetyczne historii zakonserwowanych domen białkowych”.

B. Publikacje wchodzące w skład osiągnięcia

Cykl pięciu powiązanych tematycznie publikacji o łącznym współczynniku wpływu (**impact factor**) równym 17.613 oraz łącznej **punktacji MNiSW** równej 149.

B.1 **Koczyk G (85%)**, Berezhovsky IN. (2008) **Domain Hierarchy and closed Loops (DHcL): a server for exploring hierarchy of protein domain structure**. Nucleic Acids Research; 36(Web Server issue):W239-45; IF₂₀₀₈=6.878, MNiSW₂₀₀₈=24; liczba cytowań(WoS)=15

B.2 Stępień Ł, **Koczyk G (40%)**, Waśkiewicz A. (2011) **FUM cluster divergence in fumonisins-producing Fusarium species**. Fungal Biology (*fm*. Mycological Research);

115(2):112-23; IF₂₀₁₁=1.429, MNiSW₂₀₁₁¹=35; liczba cytowań(WoS)=38

B.3 Dawidziuk A, **Koczyk G (40%)***, Popiel D, Kaczmarek J, Buśko M. (2014) **Molecular diagnostics on the toxigenic potential of *Fusarium* spp. plant pathogens**. Journal of Applied Microbiology; 116(6):1607-20; IF₂₀₁₄=2.479, MNiSW₂₀₁₄=30, liczba cytowań(WoS)=7

B.4 Popiel D, **Koczyk G (30%)**, Dawidziuk A, Gromadzka K, Błaszczak L, Chełkowski J. (2014) **Zearalenone lactonohydrolase activity in *Hypocreales* and its evolutionary relationships within the epoxide hydrolase subset of α/β -hydrolases**. BMC Microbiology; 14:82; IF₂₀₁₄=2.729, MNiSW₂₀₁₄=30; liczba cytowań(WoS)=12

B.5 **Koczyk G (70%)***, Dawidziuk A, Popiel D. (2015) **The Distant Siblings-A Phylogenomic Roadmap Illuminates the Origins of Extant Diversity in Fungal Aromatic Polyketide Biosynthesis**. Genome Biology and Evolution; 7(11):3132-54; IF₂₀₁₅=4.098, MNiSW₂₀₁₅=35 liczba cytowań(WoS)=4

*** - autor korespondencyjny**

Opis indywidualnego wkładu w powstanie każdej z publikacji znajduje się w Załączniku nr 3 (Wykaz opublikowanych prac naukowych oraz informacja o osiągnięciach dydaktycznych, współpracy naukowej i popularyzacji nauki), a indywidualne oświadczenia współautorów w Załączniku nr 5 (Oświadczenia współautorów publikacji składających się na osiągnięcie naukowe).

C. Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników, wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania

Wstęp

W ewolucji organizmów komórkowych istotną rolę na każdym etapie odgrywała modularność – wymienialność podstawowych bloków konstrukcyjnych od cząsteczek prostych związków organicznych przez makrocząsteczki białkowe i nukleotydowe, aż do kompleksów realizujących skomplikowane funkcje niezbędne dla przeżycia komórki. W kontekście białek, istotną rolę **komponentów składowych odgrywają domeny** – rozumiane jako **zakońserwowane pod względem sekwencji, niezależne energetycznie elementy struktury realizujące autonomiczne funkcje** np. regulacyjne, interakcyjne lub katalityczne. Nasze rozumienie domen jako “cegiełek” funkcjonalnych odgrywa największe znaczenie tam, gdzie plastyczność pełnionych ról (np. katalizowanych reakcji, syntetizowanych produktów) zyskuje skutek **kombinatorycznego**

1 - wartość punktacji podano dla nazwy periodyku *Mycological Research*, pod którą czasopismo umieszczono na liście A publikacji naukowych na lata 2011-2012

połączenia wielu różnych elementów – domen położonych na jednym lub wielu łańcuchach białkowych powiązanych w czasie i przestrzeni.

Szczególnie w obszarze biosyntezy tzw. metabolitów wtórnych zbiega się rola wielu różnych rodzin genowych, w tym rodzin kodujących wielodomenowe białka o ściśle skoordynowanej aktywności (syntazy poliketydów i nierybosomalnych polipeptydów). **Metabolity wtórne to szeroka grupa niskocząsteczkowych związków organicznych, z reguły będących produktem szlaków stanowiących odgałęzienie lub dodatkowe ujęcie (ang. shunt) głównych szlaków metabolicznych** (np. biosyntezy tłuszczu – poliketydy, biosyntezy aminokwasów i białek – nierybosomalne peptydy). W kontekście mikroorganizmów, ich **biosynteza nie jest konieczna do przeżycia w warunkach laboratoryjnych**, jednak rola ekologiczna obejmuje m.in. konkurencję z innymi organizmami (np. antybioza) lub ułatwianie przyswajania krytycznych składników odżywczych (np. siderofory w przyswajaniu jonów żelaza). W konsekwencji, pierwotne ludzkie zainteresowanie było najczęściej wynikiem obserwowanego efektu na życie i zdrowie ludzi oraz zwierząt hodowlanych – działania leczniczego (antybiotyki) bądź toksycznego (mykotoksyny). Przedstawione przeze mnie osiągnięcie dotyczy prac w znacznej mierze skupionych na **poznaniu historii genów biosyntezy metabolitów wtórnych, zidentyfikowaniu różnic w ich historii i historii organizmów–"nosicieli"** oraz opisie tychże w **kontekście struktury białkowej, a w szczególności architektury domenowej**. Problem ten jest nierozzerwalnie powiązany z zagadnieniem **wyodrębnienia i analizy domen białkowych w oparciu o kryteria strukturalne i sekwencyjne**, a jego praktycznym aspektem jest możliwość bezpośredniego lub pośredniego zastosowania zgromadzonej wiedzy w **diagnostyce molekularnej** ukierunkowanej na wykrywanie produkujących dany typ metabolitu (mikro)organizmów.

Przez długi czas wiedza dotycząca metabolitów wtórnych opierała się głównie na szkodliwości bądź przydatności metabolitów dla człowieka oraz pośredniej wiedzy wynikającej z eksperymentów chemicznych (np. zastosowania znakowanych radiograficznie prekursorów, prób syntezy związków w laboratoriach). Jednak, wraz z silnym rozpowszechnieniem nowych technik genomiki funkcjonalnej i sekwencjonowania nowej generacji, ostatnia dekada przyniosła olbrzymi przyrost wiedzy dotyczącej determinant genetycznych biosyntezy w organizmach żywych (zarówno eukariotycznych jak i prokariotycznych). Powstanie bibliotek mutantów delecyjnych oraz rozwój technik indukcji cichych skupisk genów biosyntezy pokazały **różnorodność, ale również niejednorodność** blisko spokrewnionych gatunków grzybów pod względem **przystosowań do "wojny chemicznej" – biosyntezy i/lub metabolizmu różnych metabolitów wtórnych**. Poznanie i zrozumienie podstaw rządzących ekologiczną rolą różnych metabolitów i wysoce nieciągłym

rozkładem występowania genów biosyntezy, jest możliwe jedynie w kontekście ewolucji i zrozumienia strukturalnych ograniczeń realizujących poszczególne funkcje składowe domen białkowych/rodzin wielogenowych.

Prace wchodzące w skład osiągnięcia:

- rozwijają **metodykę półautomatycznego analizowania dużych rodzin białkowych**, ze szczególnym uwzględnieniem **architektury domenowej**,
- poszerzają wiedzę na temat **historii ewolucyjnej metabolizmu wtórnego grzybów** (w szczególności: biosyntezy i metabolizmu makrolaktonów poliketydowych),
- dostarczają dodatkowych narzędzi **diagnostyki molekularnej oceniającej zdolności grzybów do biosyntezy i akumulacji związków toksycznych**.

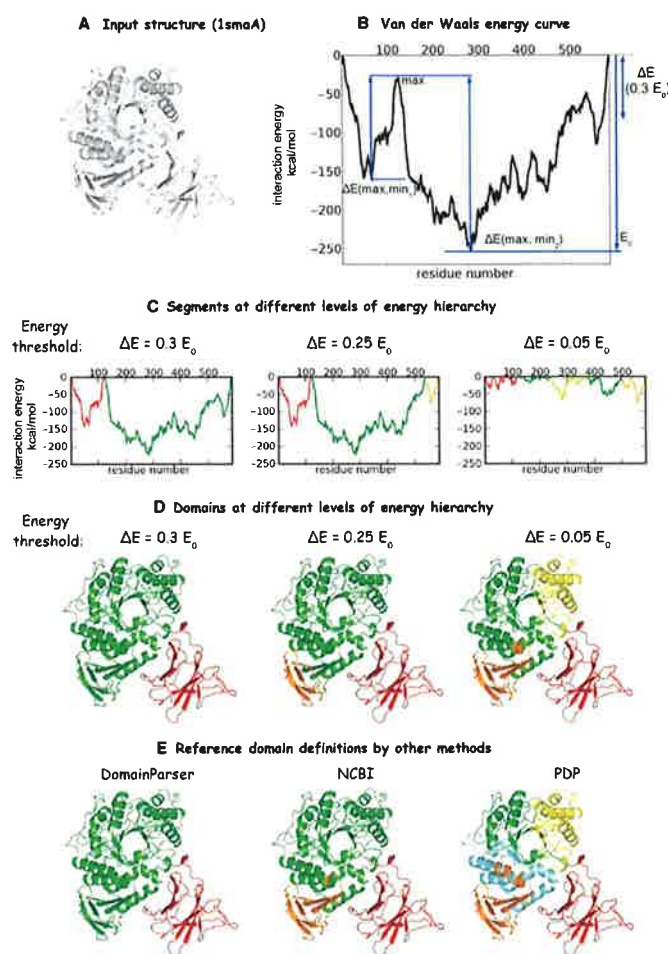
Składające się na osiągnięcie publikacje są w dużej mierze (trzy ostatnie) efektem prac założonego i kierowanego przeze mnie Zespołu Ewolucji Funkcji Systemów Biologicznych (Zakład Biometrii i Bioinformatyki, Instytut Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk). Prace obliczeniowe i eksperymentalne, w tym zakresie realizowano głównie w ramach dwu kierowanych przeze mnie grantów badawczych: NCBiR/LIDER/27/204/L-3/11/NCBR/2012 “Modelowanie, przewidywanie i weryfikacja zdolności grzybów do akumulacji toksyn” oraz NCN/SONATA/2011/03/D/NZ2/01435 “Hybrydowe, oparte na metagenomie podejście do oceny bioróżnorodności i potencjału toksygenicznego grzybów środowisk antropogenicznych”.

Dekompozycja struktury białkowej w oparciu o kryterium energetyczne umożliwia analizę architektury białek wielodomenowych

Jak wspomniano powyżej, aktywność biosyntetyczna jest często powiązana z współdziałaniem różnych domen białkowych. W metabolizmie wtórnym, szczególnie częstym “motywem przewodnim” są megasyntazy – wielkocząsteczkowe białka składające się z wielu modułów o różnej procesywności, sukcesywnie wprowadzających modyfikację do powstającego produktu. Stąd jednym z kluczowych zagadnień jest precyzyjne ustalenie granic tychże podjednostek.

W zrealizowanej przeze mnie podczas pobytu na Uniwersytecie w Bergen (Computational Biology Unit, zespół dr Igora Berezowskiego) pracy zajmowałem się analizami porównawczymi dużych zbiorów struktur białkowych oraz zaadaptowaniem algorytmów dekompozycji strukturalnej białka (Berezovsky et al. 2000; Berezovsky & Trifonov 2001), w formie dostępnego publicznie serwera (DHcL: Domain Hierarchy and closed Loops; B.1: Koczyk i Berezovsky 2008). Praca pozwoliła na wskazanie iż właściwości fizyczne (energia oddziaływań van der Waalsa pomiędzy kandydackimi domenami oraz powiązanie w jedną całość kilku przenoszących kluczowe fragmenty funkcjonalne

struktur tzw. zamkniętych pętli, odpowiadających prototypom pierwszych funkcjonalnych peptydów) umożliwia dekompozycję dużych struktur białkowych na mniejsze domeny. Przewidywane domeny odpowiadały fragmentom o dobrze zdefiniowanych właściwościach funkcjonalnych (podlegających modulacji np. podczas oddziaływań allosterycznych). Stworzona metoda pozwalała zobrazować hierarchię domen – zbliżone, choć nieidentyczne podziały na podjednostki pojawiające się w wyniku modulacji struktury białkowej przez czynniki fizyczne lub oddziaływania białko-białko. W testach porównawczych opracowana metoda dekompozycji wykazała korzystne właściwości, odzwierciedlając rozwiązania generowane przez inne narzędzia lub ekspertów w dziedzinie struktury i sekwencji białka, jako optymalne rozwiązania dla różnych poziomów energetycznych.



Rys. 1. Hierarchia struktury domenowej amylazy maltogenicznej (PDB: 1sma/A). (A) Projekcja całej struktury (B) krzywa oddziaływań van der Waalsa (C) dekompozycja na odrębne, oddziałujące segmenty dla poziomów hierarchii $0.3 E_0$, $0.25 E_0$, $0.05 E_0$ (D) domeny będące wynikiem dekompozycji dla tychże poziomów (E) struktury uzyskane przez porównywane metody (DomainParser, NCBI, PDP) odpowiadają poszczególnym poziomom hierarchii. Źródło ilustracji: autorstwo własne, wykorzystane na warunkach licencji Creative Commons By Attribution Non Commercial (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>).

W kontekście dalszych prac, dekompozycję białek (w szczególności wielodomenowych megasyntaz

poliketydowych), na niezależne domeny o własnej tożsamości ewolucyjnej i funkcjonalnej wykorzystywałem jako kluczowy koncept analizy dużych rodzin genów zaangażowanych w metabolizm wtórny. Dzięki takiemu podejściu możliwe było wnioskowanie z dużym prawdopodobieństwem gwarantujące, iż analizy *in silico*, a w szczególności rekonstrukcje filogenetyczne są oparte o kluczowe, zakonserwowane rejony wspólne dla całej rodziny genowej.

Skupisko genów biosyntezy fumonizyn wskazuje na możliwe odchylenia od wzorca wertykalnego dziedziczenia genów i umożliwia precyzyjną identyfikację producentów toksyn

W ramach pracy (B.2: Stepien i in. 2011a), przeprowadziłem analizy filogenetyczne zakonserwowanych fragmentów genów biosyntezy fumonizyn (silnie toksycznych liniowych poliketydów syntetyzowanych głównie przez grzyby z rodzaju *Fusarium*). Rekonstrukcje filogenetyczne historii ewolucyjnej genów *FUM1* (redukująca syntaza poliketydowa, w badaniach wykorzystano sekwencję kodującą odpowiadającą silnie zakonserwowanej domenie acetylotransferazowej) oraz *FUM8* (jednodomenowa oksydaza aminowa zależna od fosforanu pirydoksalu, terminator biosyntezy poliketydu) pokazały, że historia genów biosyntezy odzwierciedla historię gatunkową, jednak z pewnymi odchyleniami. Jednocześnie obecność determinanty genetycznej była skorelowana ze zdolnością do biosyntezy, ale brak było jednoznacznego powiązania polimorfizmu genetycznego z ilościową charakterystyką produkowanych toksyn.

W obrębie pojedynczych, blisko spokrewnionych gatunków pochodzenie genów biosyntezy *FUM* było monofiletyczne (silnie wsparte klady odpowiadające reprezentantom danego gatunku), jednak analiza genów i rejonów międzygenowych wskazywała na różne możliwe grupowania gatunku *F. nygamai* w kontekście kompleksu gatunkowego *Fusarium fujikuroi*. Co istotne dla dalszych prac, w trakcie analiz fragmenty genów biosyntezy okazały się silniejszymi identyfikatorami gatunków toksynotwórczych niż sekwencje markerów taksonomicznych *TEF-1a* oraz ITS rDNA (większa liczba pozycji informatywnych dla parsymonii, również po uwzględnieniu większej długości amplikonu). Wreszcie, analizy sekwencji potwierdziły zarówno znaczne różnice międzygatunkowe, jak i (w obrębie gatunków) wpływ selekcji puryfikującej na geny biosyntezy.

Opublikowane analizy wykazały zarówno wartość adaptacyjną zdolności do biosyntezy w naturze, jak i zróżnicowany potencjał do jej utraty w odmiennych warunkach (np. przy wielokrotnym pasażowaniu izolatów; większość izolatów nieprodukujących wykazywała obecność fragmentów genu *FUM8*). Zaobserwowane w trakcie przygotowywania publikacji, różnice i podobieństwa sekwencji genów biosyntezy fumonizyn, oraz możliwość precyzyjnego rozróżniania gatunków na podstawie sekwencji genów biosyntezy, dały podstawy dwóm głównym kierunkom dalszych badań:

- (1) próbie wyjaśnienia zaobserwowanych różnic na gruncie teorii ewolucji (poprzez **rozpatrywanie zgodnych z historią gatunkową scenariuszy narodzin i wymierania członków rodzin wielogenowych, z uwzględnieniem możliwości odmiennej historii ewolucyjnej różnych domen w przypadku białek wielodomenowych**),
- (2) wykorzystania w sposób racjonalny zgromadzonej informacji **dla uzyskania jak najskuteczniejszych (specyficznych i czułych) markerów molekularnych** umożliwiających pośrednią diagnostykę chemotypu (zdolności do produkcji metabolitów, w tym toksyn).

Sekwencja kodująca zakonserwowanych domen białkowych ułatwia diagnostykę molekularną zdolności do biosyntezy toksyn fuzaryjnych

W złożonym i kierowanym przeze mnie Projekcie NCBiR/LIDER/27/204/L-3/11/NCBR/2012 głównym celem było wykorzystanie zależności ewolucyjnych oraz będącego ich skutkiem obserwowalnego podobieństwa sekwencji zakonserwowanych domen białkowych do zaprojektowania i przetestowania czułej i efektywnej metody diagnostyki zdolności grzybów do biosyntezy toksyn. Oparty na sekwencji kodującej genów biosyntezy fumonizyn, trichotecenów i zearalenonu protokół amplifikacji PCR umożliwiał detekcję potencjalnych producentów z wysoką czułością i specyficznością. W początkowych fazach składania i realizacji projektu (2009-2010), stosunkowo niewiele dostępnych opcji diagnostycznych koncentrowało się na determinantach genetycznych biosyntezy toksyn, z reguły odnosząc się do genów metabolizmu podstawowego bądź łatwych do interpretacji genetycznych “kodów kreskowych” (ang. barcodes) typu np. sekwencji ITS rDNA (Niessen 2007).

Zaproponowana przez kierowany przeze mnie Zespół, diagnostyka molekularna chemotypu z wykorzystaniem markerów nakierowanych na konserwatywne miejsca podstawowych enzymów biosyntezy okazała się czuła i specyficzna (identyfikacja producentów trichotecenów z czułością rzędu 100%, specyficznością 95%; fumonizyn z czułością rzędu 94%, specyficznością 88% oraz zearalenonu z czułością i specyficznością rzędu 100%) w identyfikacji zdolności do biosyntezy toksyn (B.3: Dawidziuk i in. 2014). Co interesujące, w początkowych testach najgorsze rezultaty osiągnięto w diagnostyce zdolności do biosyntezy zearalenonu z wykorzystaniem sekwencji nieredukującej syntazy poliketydowej ZEA1 (ostatecznie wykorzystano sekwencje redukującej syntazy poliketydowej ZEA2) – możliwą przyczynę trudności zidentyfikowano w późniejszej pracy (B.5: Koczyk i in. 2015).

Isolate	<i>F. proliferatum</i> L1	+			fujikuroi
	<i>F. proliferatum</i> L3	+			
	<i>F. proliferatum</i> L7	+			
	<i>F. proliferatum</i> L18	+			
	<i>F. proliferatum</i> L21	+			
	<i>F. proliferatum</i> L44	+			
	<i>F. proliferatum</i> L58	+			
	<i>F. proliferatum</i> L59	+			
	<i>F. proliferatum</i> L66	+			
	<i>F. proliferatum</i> L82	+			
	<i>F. proliferatum</i> L84	+			
	<i>F. proliferatum</i> L85	+			
	<i>F. proliferatum</i> L99	+			
	<i>F. proliferatum</i> L111	+			
	<i>F. proliferatum</i> L113	+			
	<i>F. proliferatum</i> L143	+			
	<i>F. proliferatum</i> L142	+			
	<i>F. subglutinans</i> L60				
	<i>F. succisae</i> L4	o			
	<i>F. temperatum</i> L151				
	<i>F. verticillioides</i> L13	+			
	<i>F. verticillioides</i> L16	+			
	<i>F. verticillioides</i> L17	+			
	<i>F. verticillioides</i> L23	+			
	<i>F. verticillioides</i> L29	+			
	<i>F. verticillioides</i> L45	+			
	<i>F. verticillioides</i> L71	+			
	<i>F. verticillioides</i> L75	+			
	<i>F. verticillioides</i> L79	+			
	<i>F. verticillioides</i> L88	+			
	<i>F. xylarioides</i> L67	o			
	<i>F. equiseti</i> L72			+	incarnatum-equiseti
	<i>F. oxysporum</i> L19				oxysporum
	<i>F. oxysporum</i> L55				
	<i>F. oxysporum</i> L57				
	<i>F. oxysporum</i> L62				
	<i>F. oxysporum</i> L65				
	<i>F. oxysporum</i> L69	o			sambucinum
	<i>F. oxysporum</i> L115				
	<i>F. oxysporum</i> L131				
	<i>F. cerealis</i> L33		+	+	
	<i>F. cerealis</i> L41		+	+	
	<i>F. cerealis</i> L87		+	+	
	<i>F. culmorum</i> L48		+	+	
	<i>F. culmorum</i> L49		+	+	
	<i>F. culmorum</i> L70		+	+	
	<i>F. culmorum</i> L90		+	+	
	<i>F. culmorum</i> L93		+	+	
	<i>F. graminearum</i> L52		+	+	
	<i>F. graminearum</i> L76		+	+	
	<i>F. graminearum</i> L144		+	+	
	<i>F. graminearum</i> L149		+	+	
	<i>F. poae</i> L12				
	<i>F. sporotrichioides</i> L8		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L32		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L39		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L54		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L106		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L116		+	+	
	<i>F. sporotrichioides</i> L119		+	+	
	<i>F. solani</i> L6				solani
	<i>F. avenaceum</i> L68				tricinatum
	<i>F. avenaceum</i> L105				
	<i>F. avenaceum</i> L108				
	<i>F. avenaceum</i> L114				
	<i>F. avenaceum</i> L117				
	<i>F. avenaceum</i> L120				
	<i>F. avenaceum</i> L132				
	<i>F. tricinctum</i> L14				
	<i>F. tricinctum</i> L31				NA
	<i>F. tricinctum</i> L109				
	<i>Alternaria alternata</i> L129	o			
	<i>Alternaria alternata</i> L139				
	<i>Alternaria brassicicola</i> L128				
	<i>Alternaria</i> sp. L97				
	<i>Aspergillus niger</i> L148				
	<i>Clonostachys rosea</i> L20				
	<i>Clonostachys</i> sp. L104				
	<i>Penicillium commune</i> L136				
	<i>Penicillium commune</i> L138				
	<i>Phoma herbarum</i> L137			o	
	<i>T. aggressivum</i> L100				
	<i>T. atroviride</i> L98				
	<i>T. atroviride</i> L158				
	<i>T. hamatum</i> L95				
	<i>T. hamatum</i> L133				
	<i>T. harzianum</i> L5				
	<i>T. harzianum</i> L25				
	<i>T. harzianum</i> L123				
	<i>T. harzianum</i> L125				
	<i>T. harzianum</i> L153				
	<i>T. harzianum</i> L154				
	<i>T. longibrachiatum</i> L124		+		
	<i>T. viridescens</i> L24				
	<i>T. viridescens</i> L96				
		FUM	TRI	ZEA	Toxin

Rys. 2 Rezultaty testów amplifikacji fragmentów genów biosyntezy (fumonizyny – *FUM6*, *FUM8*, trichoteceny – *TRI5*, *TRI6*; zearalenon – *ZE42*) oraz oznaczeń chromatograficznych poziomu toksyn. Rezultaty pogrupowano według monofiletycznych kompleksów gatunkowych w obrębie rodzaju *Fusarium* opisanych w pracy (O'Donnell i in. 2013). Szary kolor tła wskazuje na obecność toksyny w hodowli na ziarnach ryżu, symbol wewnątrz pola oznacza odpowiednio: + – potwierdzoną sekwencjonowaniem specyficzną amplifikację, o – amplifikację niespecyficzną, brak symbolu – brak produktów PCR. Źródło ilustracji: autorstwo własne, wykorzystane na warunkach licencji Creative Commons By Attribution Non Commercial (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>).

Zdolność do rozkładu zearalenonu przez grzyby z rzędu *Hypocreales* wskazuje na stare ewolucyjnie pochodzenie zdolności do biosyntezy i rozkładu poliketydów makrolaktonowych

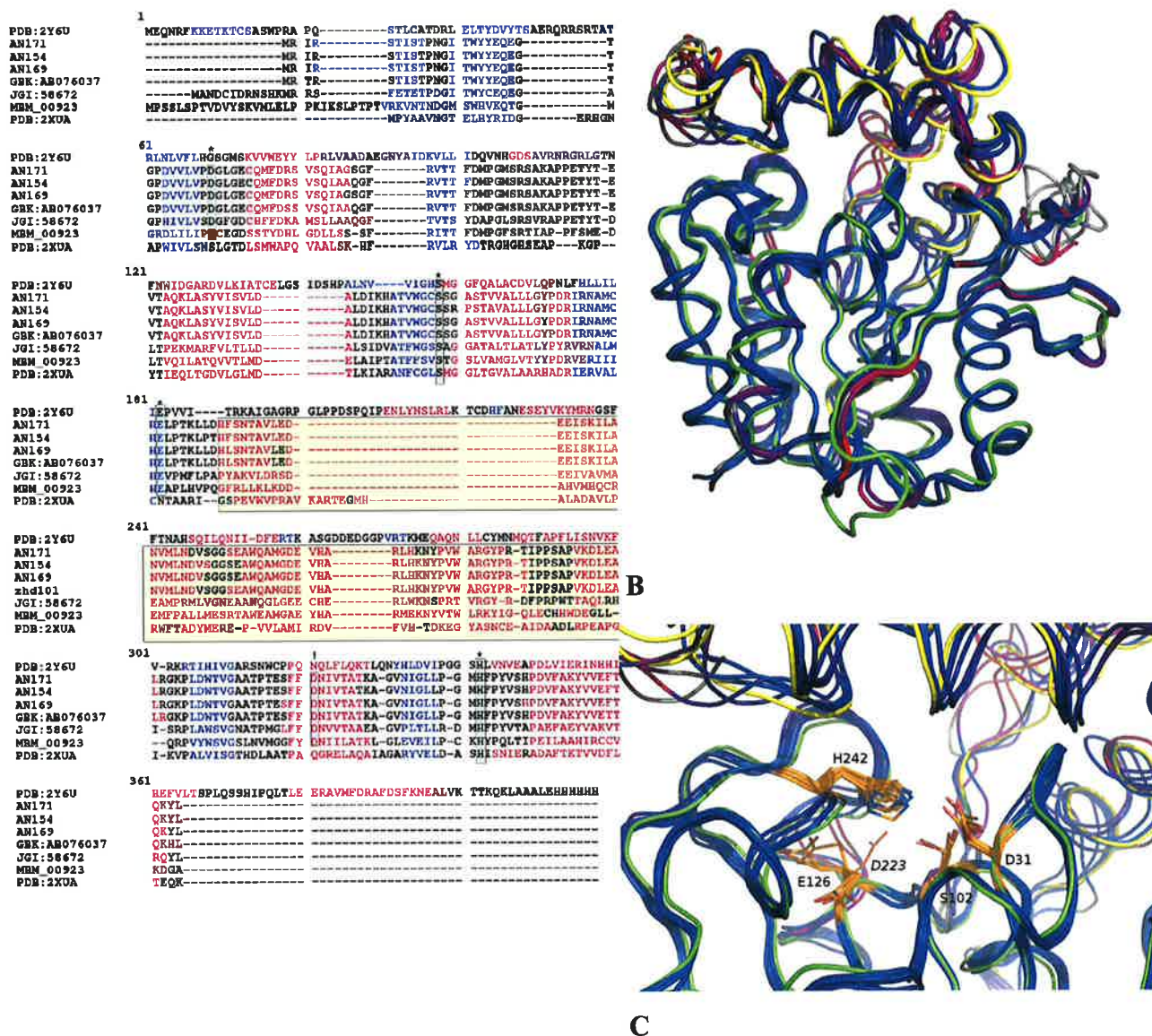
W końcowych publikacjach osiągnięcia (B.4, B.5) moje zainteresowanie skupiło się na specyficznej klasie poliketydów – makrolaktonach poliketydowych. Laktony te są najczęściej syntetyzowane przez nietypowy, tandemowy układ sprzężonych genów – silnie redukującej syntazy poliketydowej (HR-PKS; highly-reducing polyketide synthase) i nieredukującej syntazy poliketydowej (NR-PKS; non-reducing polyketide synthase). Ze względu na budowę cząsteczki (typ cyklizacji) makrolaktony można podzielić na laktony kwasu dihydroksyfenylooctowego (DALs) i laktony kwasu resorcylowego (RALs, do których należy wspomniany wcześniej zearalenon). Początkowe trudności w diagnostyce biosyntezy zearalenonu na podstawie nieredukującej syntazy poliketydowej skłoniły mnie do postawienia hipotezy, iż metabolizm makrolaktonów może być cechą ewolucyjnie starą, o znacznej fragmentacji taksonomicznej. Obserwowana przez innych autorów wielość metabolitów makrolaktonowych (Winssinger i Barluenga 2007; Shen i in. 2015) również wspierała powyższą tezę.

Dodatkowej linii argumentacyjnej, nie odwołującej się bezpośrednio do potencjału biosyntetycznego, mogłaby dostarczyć obecność ewolucyjnie starej determinanty genetycznej warunkującej rozkład tych związków. Wczesne prace eksperymentalne pokazały zdolność rozkładu zearalenonu (istotnej gospodarczo mykotoksyny, laktonu kwasu resorcylowego) jako cechę adaptacyjną mykopasożytniczych grzybów z gatunku *Clonostachys rosea* (Utermark i Karlovsky 2007). W ramach części bioinformatycznej pracy (Popiel i in. 2014) przeprowadziłem szczegółową analizę nadrodziny NAD-zależnych hydrolaz pod kątem atypowych epoksydaz, rekonstrukcje filogenetyczne oraz modelowanie struktury białkowej przez homologie – w poszukiwaniu potencjalnych laktonaz zdolnych do rozkładu zearalenonu (lub innych makrolaktonów). W połączeniu z analizą przesiewową izolatów grzybowych oraz profilowaniem ekspresji transkryptów przeprowadzonych przez dr Delfinę Popiel i dr. Adama Dawidziuka, nasza praca po raz pierwszy udowodniła zdolność grzybów z rodzaju *Trichoderma* (*T. aggressivum*) do rozkładu zearalenonu, potwierdzając jednocześnie obecność aktywnego enzymu w rodzaju *Clonostachys* (*C. rosea*, *C. catenulatum*) oraz odmienne wzorce ekspresji genu laktonazy w izolatach reprezentujących wspomniane trzy gatunki.

Dzięki analizie struktury białkowej, możliwe było określenie tożsamości triady katalitycznej (Ser/Glu/His) różnej od opisywanej we wcześniejszym piśmiennictwie (Takahashi-Ando i in. 2004). Kluczową innowacją pracy było wykorzystanie częściowo nadzorowanej analizy skupień do selekcji dywergentnych hydrolaz (hydrolaz epoksydowych) spokrewnionych z laktonazą

zearalenonową *Clonostachys rosea*. Analizy filogenetyczne i modelowanie struktury pośrednio wskazały również obecność homologów laktonazy o zakonserwowanych kluczowych dla funkcji resztach, w stosunkowo niedawno poznanych genomach modelowych *Marssonina brunea* i *Apiospora montagnei*.

Podsumowując, przeprowadzone analizy *in silico* dostarczyły argumentów wspierających dla tezy, iż zdolność do rozkładu makrolaktonów jest prawdopodobnie starą ewolucyjnie cechą grzybów nitkowatych, współdzieloną przez różne mykopasożytnicze gatunki z rzędu *Hypocreales*, ale obecną również u pojedynczych gatunków reprezentujących inne *Sordariomycetes* i *Leotiomycetes*. Co istotne, kolejne lata przyniosły eksperymentalne potwierdzenie wniosków uzyskanych *in silico* przez niezależne zespoły badawcze zainteresowane aktywnością enzymatyczną laktonaz (Peng et al. 2014; Hui et al. 2017).



A

Rys. 3 Obecność homologów laktonazy zearalenonowej o zakonserwowanej strukturze białkowej i resztach miejsca aktywnego jest cechą wspólną różnych, odległych gatunków grzybów nitkowatych. Na panelu A pokazano dopasowanie sekwencji z różnych gatunków (sekwencje wzorcowych hydrolaz epoksydowych PDB: 2XUA, 2Y6U, homologi laktonazy zearalenonowej z badanych izolatów (AN154, AN169, AN171) oraz genomów referencyjnych (GBK:AB076037, *B. ochroleuca*; JGI:58672, *A. montagnei*; GBK:EKD21810, *M. brunnea*). Reszty katalityczne zaznaczono gwiazdkami, kolory niebieski i czerwony oznaczają odpowiednio alfa-helisy i beta-harmonijki, domena zamykająca ('cap') oznaczona na żółto. Na panelu B modele pokazano nałożenie modeli strukturalnych laktonaz na strukturę wzorcową PDB: 2XUA (laktonaza 3-oxoadypinianowa, domena katalityczna w kolorze zielonym, domena zamykająca w kolorze żółtym) w którym otrzymane modele pokolorowano według średniego odchylenia odległości odpowiadających sobie atomów Ca (spektrum od niebieskiego – najlepsze dopasowanie, do czerwonego – reprezentującego dopasowanie najgorsze). Na panelu C pokazano w powiększeniu postulowane miejsce aktywne (S102, H223, E126/D31; uprzednio opisywana w literaturze reszta D223 zajmuje w modelach odległą od innych reszt pozycję). Źródło ilustracji: autorstwo własne, wykorzystane na warunkach licencji Creative Commons By Attribution Non Commercial (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>).

Filogenomiczna mapa drogowa nieredukujących syntaz poliketydowych ujawnia wyspy “dalekich krewnych” wśród genów głównych biosyntezy poliketydów

Omawiane wcześniej wątki w pełni łączy ostatnia praca z prezentowanego osiągnięcia, gdzie efekty dekompozycji domenowej białek (NR-PKS – nieredukujących syntaz poliketydowych) połączono z badaniem procesu ewolucyjnego przez wielkoskalową rekonstrukcję filogenezy oraz uzgadnianie (rekoncyliację) uzyskanych historii genów i gatunków (B.5: Koczyk i in. 2015). Zarówno ze względu na pierwotne trudności w diagnostyce molekularnej wykorzystującej geny NR-PKS, jak i relatywnie lepszą charakteryzację eksperymentalną nieredukujących syntaz (poznane mechanizmy cyklizacji, znaczny postęp w kombinatorycznej analizie roli poszczególnych domen białkowych) w ostatniej pracy skupiłem się na tej rodzinie białkowej. W poprzedzających publikację latach powstawało wiele prac udowadniających rolę transferu horyzontalnego (Khaldi i Wolfe 2011; Slot i Rokas 2011; Schmitt i Lumbsch 2009) w ewolucji ścieżek biosyntezy wtórnych metabolitów jednak w znacznej większości były to prace koncentrujące się na losie pojedynczych klastrów lub szlaków biosyntezy. Zrealizowana, przez kierowany przeze mnie Zespół, analiza była pierwszą analizą filogenomiczną o takiej skali i szczegółowości. Na grupie ponad 100 modelowych gatunków grzybów wyższych (zarówno podstawczaków jak i workowców) oraz ponad 400 nieredukujących syntaz poliketydowych pokazano w sposób jakościowy i ilościowy strukturę “odległych krewnych” wyjaśniającą różnorodność cyklicznych poliketydów aromatycznych. Dzięki połączeniu dwóch technik rekonyliacji drzew filogenetycznych (losowe próbkowanie rekonyliacji maksymalnie parsymonicznych i estymacja zamalgamowanej wiarygodności) wskazaliśmy starożytne duplikacje, transfery horyzontalne oraz masowe utraty genów biosyntetycznych towarzyszące ewolucji szlaków biosyntezy poliketydów aromatycznych. W pracy zaproponowałem autorskie podejście do rekonstrukcji filogenomicznych oparte na nienadzorowanej analizie skupień (zbiorów sekwencji o podobnej architekturze domenowej) w oparciu o kryterium szerokości sylwetki (silhouette width – Rousseeuw 1987). Prowadzone badania wykorzystywały na wstępnym i późniejszych etapach dekompozycję dużych białek na pojedyncze domeny z wykorzystaniem zarówno sekwencji (ukryte modele Markowa zgromadzone w bazie Pfam-A), jak i właściwości strukturalnych (analiza struktury genu naniesionej na strukturę domenową – Rys. 5).

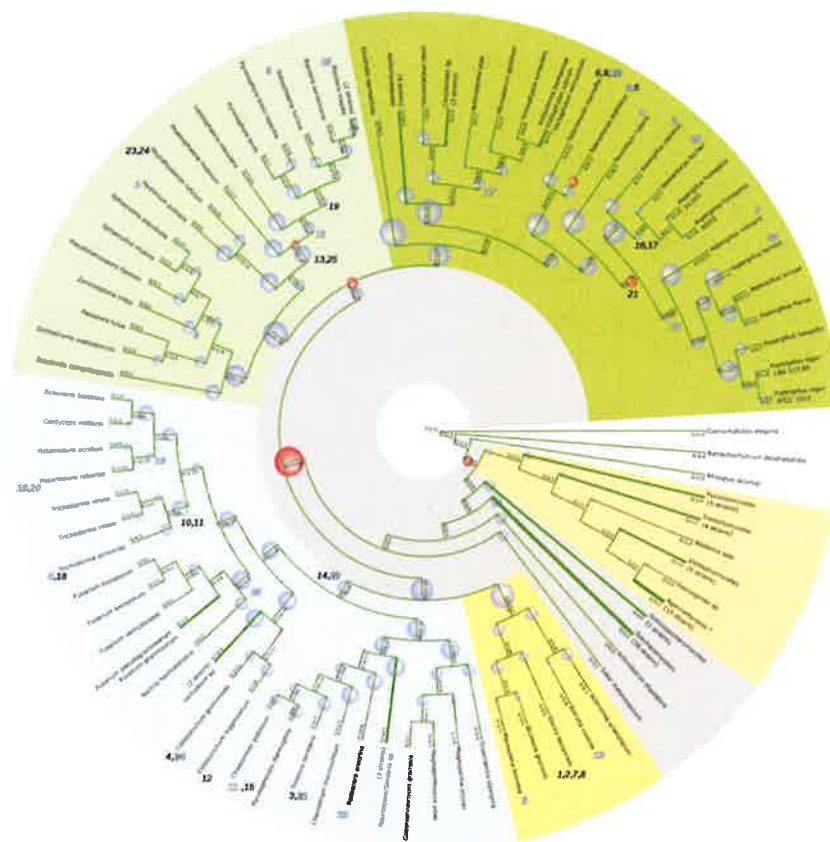
W odniesieniu do makrolaktonów przeprowadzone rekonstrukcje uwiarygodniły zarówno szczególnie częsty wzorec transferów horyzontalnych jak i wczesne ewolucyjne pochodzenie genów kodujących “makrolaktonowe” NR-PKS (patrz Rys. 4 – grupa C2-C7a). Prace dotyczące laktonów są przez Zespół kontynuowane w ramach kierowanego przeze mnie grantu badawczego “Geneza i rozpowszechnienie zdolności do biosyntezy oraz metabolizmu makrolaktonów wśród grzybów

wyższych” (NCN/OPUS/2016/21/B/NZ9/01875).

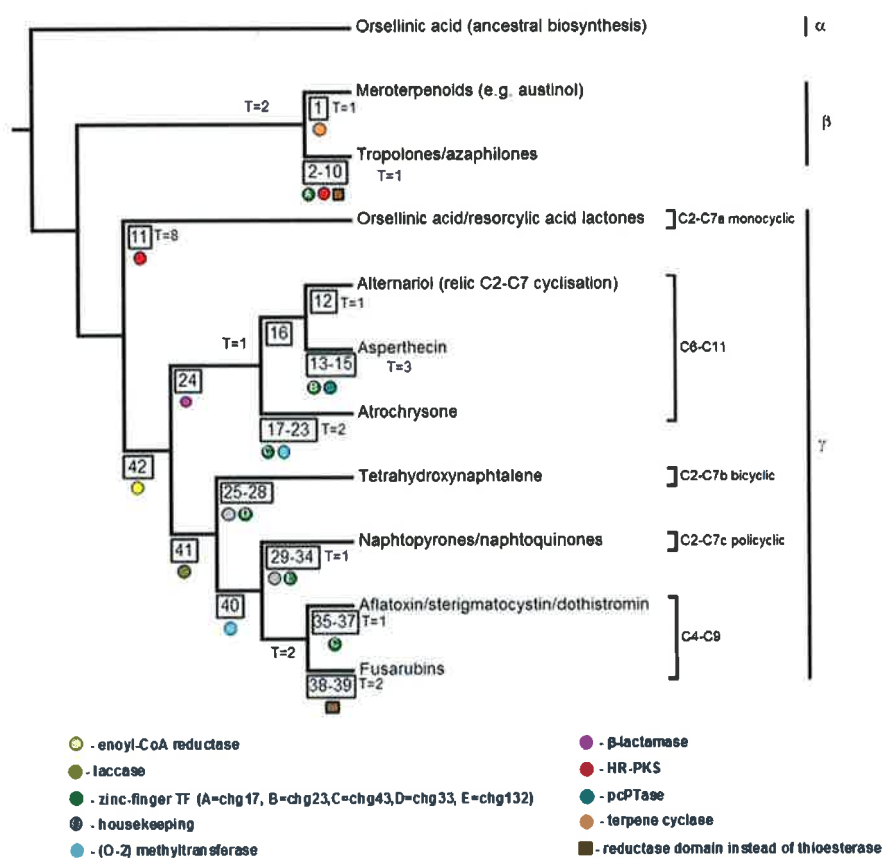
W pracy poza szeregiem uprawdopodobnionych zdarzeń transferu horyzontalnego (25 zdarzeń, w tym nieopisywane wcześniej transfery m.in. w ewolucji biosyntezy fuzarubin) wykazałem ponadto:

- (1) monofiletyczne i wczesne (względem historii ewolucyjnej grzybów nitkowatych) pochodzenie różnych innowacji mechanistycznych (jako wyniku duplikacji poprzedzających rozejście się głównych klas grzybów nitkowatych), w tym:
 - (1) aktywności cyklizacyjnych: C4-C9, C6-C11,
 - (2) pozyskiwania genów akcesorycznych takich jak lakkazy lub Mn-zależne laktamazy),
- (2) odmienną historię różnych domen składowych NR-PKS (dwukrotne niezależne pozyskanie NADPH-zależnej domeny reduktazowej – patrz Rys. 3)
- (3) ortologiczny charakter genu głównego biosyntezy melanin u większości przedstawicieli *Sordariomycetes*, *Leotiomycetes* i *Dothideomycetes* uprawniający do stosowania tego genu jako pomocniczy marker taksonomiczny,
- (4) szlaki alternatywnej biosyntezy melanin (poprzez naftopiron YWA1), jako źródło późniejszych innowacji molekularnych w biosyntezie aflatoksyn i fuzarubin (cyklizacja typu C4-C9, rekrutacja dodatkowych enzymów akcesorycznych – patrz też Rys. 4B)

Warto podkreślić, iż późniejsze prace innych zespołów potwierdziły zdolność podejścia “filogenomicznej mapy drogowej” do przewidywania zdarzeń ewolucyjnych, niezależnie wykazując przewidziane przez nas w pracy transfery genów (geny biosyntezy sorbicylinoidów w *Penicillium chrysogenum* - Druzhinina i in. 2016, geny biosyntezy cerkosporyny w rodzaju *Colletotrichum* - de Jonge i in. 2018). Przeprowadzone analizy porównawcze przyniosły również analizowany do tej pory rezultat częściowy – granice miejsc splicingowych w szerokim zbiorze megasyntaz NR-PKS dzieliły w sposób uporządkowany strukturę białkową. Jednak powstałe podziały tylko częściowo odzwierciedlały granice niezależnych (wg kryterium energetycznego) domen wyznaczonych przy pomocy DHcL (Koczyk i in., nieopublikowane – Rys. 5).

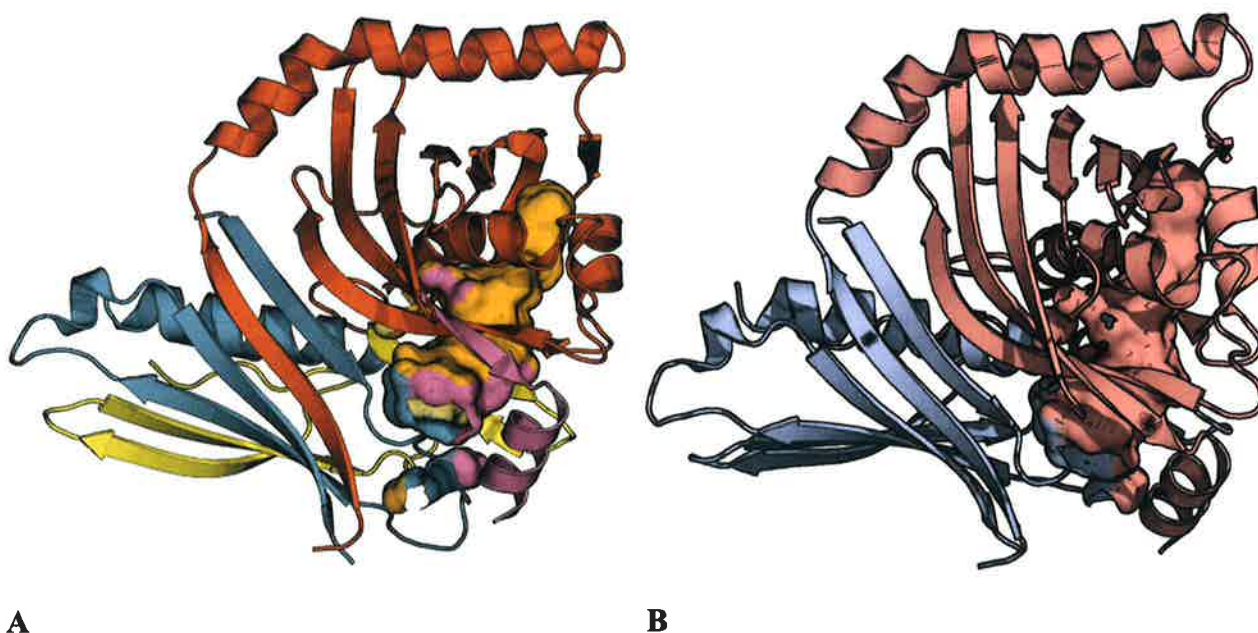


A



B

Rys. 4 Analiza filogenomiczna NR-PKS ujawniła, iż współczesne syntazy NR-PKS mają charakter “odległych krewnych” (distant siblings) gdzie pochodzenie grup funkcjonalnych ortologów można przypisać starożytnym duplikacjom w większości poprzedzających rozdzielenie się głównych linii ewolucyjnych wśród workowców oraz znacznej utracie genów, łagodzonej w pewnym stopniu przez transfery horyzontalne – również pomiędzy odległymi gatunkowo donorami i akceptorami. Na panelu A przedstawiono ilościową reprezentację duplikacji (czerwone sfery), delecji (fioletowe sfery) i transferów (liczby – w wypełnionym lub pustym obrysie, odpowiednio dla donorów i akceptorów). Na panelu B pokazano monofiletyczne pochodzenie syntaz poliketydowych o różnym typie cyklizacji oraz pochodzenie biosyntezy poprzez cyklizację C4-C9 (aflatoksyny, fuzarubiny) jako odgałęzienia alternatywnego szlaku biosyntezy melaniny. Różnokolorowe kwadraty reprezentują zakonserwowane rodziny genów akcesorycznych powiązane z monofiletycznymi kładami drzewa genowego. Źródło ilustracji: autorstwo własne, (Koczyk i in. 2015), wykorzystane na warunkach licencji Creative Commons By Attribution Non Commercial (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>).



Rys. 5 W obrębie domeny cyklizującej (wzorcowania produktu, product template, PT): (A) fragmenty odpowiadające poszczególnym egzonom kontrolują dostęp do komory miejsca aktywnego (źródło: autorstwo własne, (Koczyk i in. 2015), wykorzystane na warunkach licencji Creative Commons By Attribution Non Commercial; <http://creativecommons.org/licenses/by-nc/2.0/uk/>). (B) Taki podział struktury białkowej jedynie częściowo odpowiada niezależnym energetycznie elementom z różnych poziomów hierarchii domenowej (Koczyk et al., nieopublikowane)

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo - badawczych

Pełen wykaz osiągnięć został zamieszczony w Załączniku nr 3, poniżej przedstawiam krótkie podsumowanie najważniejszych danych bibliometrycznych oraz skrócony opis najważniejszych osiągnięć.

	Liczba prac	Sumaryczny impact factor	Sumaryczna liczba punktów MNIŚW	Sumaryczna liczba cytowań
Publikacje z listy filadelfijskiej, w tym:	28	67.459	723	404
wchodzące w skład osiągnięcia habilitacyjnego	5	17.613	154	76
pozostałe, po uzyskaniu stopnia doktora	14	34.122	334	237
pozostałe, przed uzyskaniem stopnia doktora	9	15.724	235	91
Indeks Hirscha (wg bazy Web of Science):	12			

Po złożeniu do recenzji w roku 2007 pracy doktorskiej, przebywałem na stażu na Uniwersytecie w Bergen (Computational Biology Unit, grupa Igora Bierzowskiego) – po powrocie kontynuowałem prace badawcze w ramach Zakładu Biometrii i Bioinformatyki w Instytucie Genetyki Roślin Polskiej Akademii Nauk. Pod koniec roku 2012, skompletowany przeze mnie Zespół realizujący grant I konkursu programu Narodowego Centrum Badań i Rozwoju LIDER zyskał formalne ugruntowanie. Powstały Zespół Ewolucji Funkcji Systemów Biologicznych działa pod moim kierownictwem nieprzerwanie aż do chwili obecnej.

W ostatnich latach, oprócz omówionych wcześniej prac składających się na osiągnięcie, moje badania skupiały się na głównych aspektach: szeroko pojętej genomiki ewolucyjnej grzybów i roślin oraz filogenetyki mikroorganizmów w aspekcie ich diagnostyki molekularnej. Prace realizowałem w ramach 3 kierowanych przeze mnie grantów badawczych, badań statutowych oraz jako wykonawca w dalszych 8 projektach (w tym 3 kierowanych w Zespole Ewolucji Funkcji Systemów Biologicznych – 2 przez dr Delfinę Popiel oraz 1 przez dr Katarzynę Czyż). Wyniki realizowanych w Zespole prac naukowych prezentowałem na międzynarodowych i krajowych konferencjach naukowych (7 referatów, 20 posterów), jak również podczas organizowanych przez zespół warsztatów „Diagnostyka molekularna mikroorganizmów – identyfikacja, toksynotwórczość, oporność” (2013).

Opublikowane do tej pory prace kierowanego przeze mnie Zespołu, realizowane w grantach kierowanych przez dr Delfinę Popiel, obejmowały zagadnienia związane z biosyntezą i odpornością na substancje grzybobójcze – w kontekście niszy ekologicznej zajmowanej przez dany organizm. Podejmowane zagadnienia zawierały rolę metabolitów wtórnych w odpowiedzi *Fusarium* sp. na obecność w środowisku naturalnych i sztucznych substancji grzybobójczych (Dawidziuk i in. 2016; Popiel i in. 2017) oraz biologii translacyjnej odporności na fungicydy *Fusarium* sp. (identyfikacja i zbadanie homologów drożdżowych czynników odporności na azole – Popiel i in. 2017). W ramach współpracy z zajmującą się hodowlą mikroalg firmą AlgaeLabs sp. z o.o. opracowaliśmy również test umożliwiający ocenę czystości kultur *Haematococcus pluvialis* w obecności zanieczyszczających glonów bądź grzybów (Dawidziuk i in. 2017).

W badaniach z zakresu genomiki i diagnostyki molekularnej grzybów fitopatogenicznych moja współpraca z innymi zespołami badawczymi koncentrowała się na udziale w projektowaniu badań (markery molekularne oparte na PCR), analizach filogenetycznych oraz statystycznych głównie grzybów z rodzajów *Fusarium* (Stepień et al. 2008; Stepień et al. 2011b, 2013) i *Trichoderma* (Błaszczuk i in. 2011). W wymienionych pracach, mój wkład przyczynił się do określenia zdolności sekwencji ITS rDNA oraz fragmentów genu TEF-1a do identyfikacji taksonomicznej oraz scharakteryzowania różnorodności gatunkowej i fenotypowej słabiej poznanych reprezentantów obu rodzajów (m.in. oportunistyczny patogen roślin uprawnych *Fusarium proliferatum* oraz szereg gatunków *Fusarium* sp. infekujących ananasa jadalnego).

Jednocześnie współpracując, od roku 2015, z Zespołem prof. Magdy Krzymowskiej (Instytut Biochemii i Biofizyki PAN) wykorzystałem rozwinięte w Zespole podejście do analiz filogenomicznych aby zrekonstruować historię ewolucyjną rodziny nukleaz podobnych do bakteryjnego białka HopQ oraz rozważyć możliwość wystąpienia dawnego transferu genów pomiędzy mszakami a grzybami w toku ewolucji tej grupy czynników wirulencji (Piechocki i in. 2018)

W zakresie genomiki ewolucyjnej roślin moje badania skupiały się głównie na rodzinach krzyżowych (*Brassicaceae* – Ziolkowski i in. 2009; Kaczmarek i in. 2009) oraz strączkowych (*Fabaceae* – Kroc i in. 2014). Opublikowane do tej pory prace wykazały *in silico* istotne podobieństwa synteniczne oraz przyczyniły się do zrozumienia istotnych mechanizmów generujących mutacje typu insercji-delecji w genomie *Arabidopsis* (Ziolkowski i in. 2009; praca nagrodzona w 2009 roku nagrodą Polskiego Towarzystwa Genetycznego w zakresie genetyki roślin). Podobnie, w ramach kierowanej przez dr Magdalenę Kroc (Instytut Genetyki Roślin PAN) współpracy scharakteryzowano i opisano ślady starożytnej duplikacji całogenomowej w genomie

łubinu wąskolistnego (Kroc i in. 2014), a kolejna praca zawierająca wyniki składania *de novo* oraz wielokryterialnej analizy transkryptomu łubinu w biosyntezie alkaloidów znajduje się obecnie w recenzji. W ostatniej pracy (Fedorowicz-Strońska i in. 2016) pokazano relacje pomiędzy homologami kinaz zależnych od wapnia z gatunków modelowych, dostarczając dowodów na poparcie hipotezy o niezależnej dywersyfikacji kinomu jedno- i dwuliściennych oraz rozstrzygając wzajemne relacje pomiędzy homologami jęczmiennych kinaz białkowych w modelowych gatunkach: *Brachypodium distachyon* oraz *Oryza sativa* ssp. *japonica*. W poprzednich latach współpracowałem również przy analizie statystycznej danych obrazujących zmiany metabolomu w stresie abiotycznym w odmianach trawy *Festuca pratensis* charakteryzujących się różnym stopniem odporności na stres chłodu (Bocian i in. 2015).

W trakcie realizacji w/w prac badawczych i badawczo-rozwojowych współpracowałem zarówno z naukowcami z Instytutu Genetyki Roślin (reprezentujących Zakłady Genetyki i Odporności Roślin, Genomiki oraz Biologii Stresów Środowiskowych), jak również badaczami z innych ośrodków – m.in.:

- (1) Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza (prof. Jan Sadowski, dr hab. Piotr Ziółkowski – Instytut Biologii Molekularnej i Biotechnologii),
- (2) Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu (dr hab. Agnieszka Waśkiewicz, dr hab. Karolina Gromadzka, dr Maciej Buśko - Katedra Technologii Drewna, Zakład Chemii Analitycznej),
- (3) Politechniki Poznańskiej (dr hab. Małgorzata Basińska – wykonawca w kierowanym przeze mnie projekcie SONATA),
- (4) Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN (prof. Magda Krzymowska),
- (5) Centrum Onkologii im. Marii Skłodowskiej-Curie (dr hab. Lucjan Wyrwicz - w zakresie interpretacji podobieństw białka UL-34 wirusa HSV-1 do eukariotycznych białek wiążących fosfoinozytole - Wyrwicz i in. 2008),
- (6) University of Western Australia (dr Matthew Nelson, obecnie: Kew Gardens, Londyn, Wielka Brytania)
- (7) United States Department of Agriculture, Agricultural Research Service (prof. Gary J. Samuels – Systematic Mycology and Microbiology Laboratory)

W latach 2014-2016 kierowany przeze mnie Zespół współpracował również ze wspomnianą już firmą AlgaeLabs, a od roku 2016 prowadzę aktywną współpracę z Działem Badań i Rozwoju Centrów Genetyki Medycznej Genesis, w zakresie projektowania i analizy bioinformatycznej wyników testów z zakresu genetyki klinicznej (w tym testów na choroby rzadkie opartych na

technologii sekwencjonowania półprzewodnikowego IonTorrent).

Do chwili obecnej byłem promotorem jednej pracy licencjackiej (lic. Zuzanna Dutkiewicz) oraz jednej pracy doktorskiej (promotor pomocniczy; dr Pedro Madrigal). Jestem również promotorem pomocniczym w jednym trwającym przewodzie doktorskim (po otwarciu, mgr Hanna Ćwiek-Kupczyńska) oraz opiekunem naukowym dwóch doktorantów na wczesnym etapie pracy badawczej (mgr Michał Kawaliło – w ramach trwającego grantu NCN/OPUS koncentrującego się na poznaniu mechanizmów rządzących biosyntezą makrolaktonów, mgr Piotr Zaremba – w ramach badań statutowych Zakładu Biometrii i Bioinformatyki dotyczących nowych metod porównywania sekwencji).

Piśmiennictwo

- Berezovsky IN, Esipova NG, Tumanyan VG, Namiot VA. 2000. A new approach for the calculation of the energy of van der Waals interactions in macromolecules of globular proteins. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 17:799–809. doi: 10.1080/07391102.2000.10506569.
- Berezovsky IN, Trifonov EN. 2001. Van der Waals locks: loop-n-lock structure of globular proteins. *J. Mol. Biol.* 307:1419–1426. doi: 10.1006/jmbi.2001.4554.
- Błaszczak L et al. 2011. Species diversity of *Trichoderma* in Poland. *J. Appl. Genet.* 52:233–243. doi: 10.1007/s13353-011-0039-z.
- Bocian A et al. 2015. Metabolite profiling during cold acclimation of *Lolium perenne* genotypes distinct in the level of frost tolerance. *J. Appl. Genet.* 56:439–449. doi: 10.1007/s13353-015-0293-6.
- Dawidziuk A et al. 2017. Assessing contamination of microalgal astaxanthin producer *Haematococcus* cultures with high-resolution melting curve analysis. *J. Appl. Genet.* 58:277–285. doi: 10.1007/s13353-016-0378-x.
- Dawidziuk A, Koczyk G, Popiel D. 2016. Adaptation and response to mycotoxin presence in pathogen-pathogen interactions within the *Fusarium* genus. *World Mycotoxin J.* 9:565–575. doi: 10.3920/WMJ2015.2010.
- Dawidziuk A, Koczyk G, Popiel D, Kaczmarek J, Buśko M. 2014. Molecular diagnostics on the toxigenic potential of *Fusarium* spp. plant pathogens. *J. Appl. Microbiol.* 116:1607–1620. doi: 10.1111/jam.12488.
- Druzhinina IS, Kubicek EM, Kubicek CP. 2016. Several steps of lateral gene transfer followed by events of ‘birth-and-death’ evolution shaped a fungal sorbicillinoid biosynthetic gene cluster. *BMC Evol. Biol.* 16:269. doi: 10.1186/s12862-016-0834-6.
- Fedorowicz-Strońska O, Koczyk G, Kaczmarek M, Krajewski P, Sadowski J. 2016. Genome-wide identification, characterisation and expression profiles of calcium-dependent protein kinase genes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J. Appl. Genet.* 1–12.
- Hui R et al. 2017. Characterization and crystal structure of a novel zearalenone hydrolase from *Cladophialophora bantiana*. *Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Commun.* 73:515–519. doi: 10.1107/S2053230X17011840.
- de Jonge R et al. 2018. Gene cluster conservation provides insight into cercosporin biosynthesis and extends production to the genus *Colletotrichum*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115:E5459–E5466. doi: 10.1073/pnas.1712798115.
- Kaczmarek M, Koczyk G, Ziolkowski PA, Babula-Skowronska D, Sadowski J. 2009. Comparative analysis of the *Brassica oleracea* genetic map and the *Arabidopsis thaliana* genome. *Genome Natl. Res. Counc. Can. Génome Cons. Natl. Rech. Can.* 52:620–633. doi: 10.1139/G09-035.
- Khalidi N, Wolfe KH. 2011. Evolutionary Origins of the Fumonisin Secondary Metabolite Gene Cluster in *Fusarium verticillioides* and *Aspergillus niger*. *Int. J. Evol. Biol.* 2011:423821. doi: 10.4061/2011/423821.
- Koczyk G, Berezovsky IN. 2008. Domain Hierarchy and closed Loops (DHcL): a server for exploring hierarchy of protein domain structure. *Nucleic Acids Res.* 36:W239–245. doi: 10.1093/nar/gkn326.
- Koczyk G, Dawidziuk A, Popiel D. 2015. The Distant Siblings-A Phylogenomic Roadmap Illuminates the Origins of Extant Diversity in Fungal Aromatic Polyketide Biosynthesis. *Genome Biol. Evol.* 7:3132–3154. doi: 10.1093/gbe/evv204.
- Kroc M, Koczyk G, Święcicki W, Kilian A, Nelson MN. 2014. New evidence of ancestral polyploidy in the Genistoid

- legume *Lupinus angustifolius* L. (narrow-leaved lupin). TAG Theor. Appl. Genet. Theor. Angew. Genet. 127:1237–1249. doi: 10.1007/s00122-014-2294-y.
- Niessen L. 2007. PCR-based diagnosis and quantification of mycotoxin producing fungi. Int. J. Food Microbiol. 119:38–46. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2007.07.023.
- O'Donnell K et al. 2013. Phylogenetic analyses of RPB1 and RPB2 support a middle Cretaceous origin for a clade comprising all agriculturally and medically important fusaria. Fungal Genet. Biol. FG B. 52:20–31. doi: 10.1016/j.fgb.2012.12.004.
- Peng W et al. 2014. Crystal structure and substrate-binding mode of the mycoestrogen-detoxifying lactonase ZHD from *Clonostachys rosea*. RSC Adv. 4:62321–62325. doi: 10.1039/C4RA12111B.
- Piechocki M, Giska F, Koczyk G, Grynberg M, Krzymowska M. 2018. An Engineered Distant Homolog of *Pseudomonas syringae* TTSS Effector From *Physcomitrella patens* Can Act as a Bacterial Virulence Factor. Front. Microbiol. 9. doi: 10.3389/fmicb.2018.01060.
- Popiel D et al. 2014. Zearalenone lactonohydrolase activity in *Hypocreales* and its evolutionary relationships within the epoxide hydrolase subset of a/b-hydrolases. BMC Microbiol. 14:82. doi: 10.1186/1471-2180-14-82.
- Popiel D, Dawidziuk A, Koczyk G, Mackowiak A, Marcinkowska K. 2017. Multiple facets of response to fungicides - the influence of azole treatment on expression of key mycotoxin biosynthetic genes and candidate resistance factors in the control of resistant *Fusarium* strains. Eur. J. Plant Pathol. 147:773–785. doi: 10.1007/s10658-016-1042-3.
- Rousseeuw PJ. 1987. Silhouettes: A graphical aid to the interpretation and validation of cluster analysis. J. Comput. Appl. Math. 20:53–65. doi: 10.1016/0377-0427(87)90125-7.
- Schmitt I, Lumbsch HT. 2009. Ancient horizontal gene transfer from bacteria enhances biosynthetic capabilities of fungi. PloS One. 4:e4437. doi: 10.1371/journal.pone.0004437.
- Shen W, Mao H, Huang Q, Dong J. 2015. Benzenediol lactones: a class of fungal metabolites with diverse structural features and biological activities. Eur. J. Med. Chem. 97:747–777. doi: 10.1016/j.ejmech.2014.11.067.
- Slot JC, Rokas A. 2011. Horizontal transfer of a large and highly toxic secondary metabolic gene cluster between fungi. Curr. Biol. CB. 21:134–139. doi: 10.1016/j.cub.2010.12.020.
- Stepien L, Koczyk G, Waskiewicz A. 2013. Diversity of *Fusarium* species and mycotoxins contaminating pineapple. J. Appl. Genet. 54:367–380. doi: 10.1007/s13353-013-0146-0.
- Stepien L, Koczyk G, Waskiewicz A. 2011a. FUM cluster divergence in fumonisins-producing *Fusarium* species. Fungal Biol. 115:112–123. doi: 10.1016/j.funbio.2010.10.011.
- Stepien L, Koczyk G, Waskiewicz A. 2011b. Genetic and phenotypic variation of *Fusarium proliferatum* isolates from different host species. J. Appl. Genet. 52:487–496. doi: 10.1007/s13353-011-0059-8.
- Stepień Ł, Popiel D, Koczyk G, Chełkowski J. 2008. Wheat-infecting *Fusarium* species in Poland--their chemotypes and frequencies revealed by PCR assay. J. Appl. Genet. 49:433–441. doi: 10.1007/BF03195644.
- Takahashi-Ando N et al. 2004. Metabolism of zearalenone by genetically modified organisms expressing the detoxification gene from *Clonostachys rosea*. Appl. Environ. Microbiol. 70:3239–3245. doi: 10.1128/AEM.70.6.3239-3245.2004.
- Utermark J, Karlovsky P. 2007. Role of zearalenone lactonase in protection of *Gliocladium roseum* from fungitoxic effects of the mycotoxin zearalenone. Appl. Environ. Microbiol. 73:637–642. doi: 10.1128/AEM.01440-06.
- Winssinger N, Barluenga S. 2007. Chemistry and biology of resorcylic acid lactones. Chem. Commun. Camb. Engl. 22–36. doi: 10.1039/b610344h.
- Wyrwicz LS, Koczyk G, Rychlewski L. 2008. Homologues of HSV-1 nuclear egress factor UL34 are potential phosphoinositide-binding proteins. Acta Biochim. Pol. 55:207–213.
- Ziolkowski PA, Koczyk G, Galganski L, Sadowski J. 2009. Genome sequence comparison of Col and Ler lines reveals the dynamic nature of *Arabidopsis* chromosomes. Nucleic Acids Res. 37:3189–3201. doi: 10.1093/nar/gkp183.