

dr Magdalena Wołoszyńska
Katedra Genetyki
Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt
Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu
ul. Koźuchowska 7
51-631 Wrocław

Załącznik 2a
Autoreferat

**Epigenetyczna regulacja ekspresji
genów u roślin**

Spis treści

| | |
|---|----|
| 1. Imię i nazwisko | 3 |
| 2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe..... | 3 |
| 3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych..... | 3 |
| 4. Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego | 4 |
| 4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego | 4 |
| 4.2 Publikacje..... | 4 |
| 4.3 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników..... | 5 |
| 4.3.1 Wprowadzenie..... | 5 |
| 4.3.2 Stan wiedzy | 5 |
| 4.3.2.1 Znaki epigenetyczne | 6 |
| 4.3.2.2 Elongator – kompleks białkowy acetylujący histony podczas elongacji transkrypcji..... | 8 |
| 4.3.2.3 Monoubikwitynacja histonów i kompleks HUB1/HUB2..... | 9 |
| 4.3.2.4 Metylacja DNA | 9 |
| 4.3.3 Cel badań | 11 |
| 4.3.4 Uzyskane wyniki | 11 |
| 4.3.4.1 Elongator reguluje kiełkowanie, wczesny wzrost i rozwój hipokotyli w ciemności oraz podczas fotomorfogenezy..... | 11 |
| 4.3.4.2 Monoubikwitynacja histonów H2B przez czynnik elongacji transkrypcji HUB1 ułatwia osiągnięcie maksymalnego poziomu transkrypcji genów zegara okołodobowego..... | 19 |
| 4.3.4.3 Adaptacja i zastosowanie metody Plant-RRBS..... | 20 |
| 4.3.5 PODSUMOWANIE | 24 |
| 5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych | 25 |
| 5.1 Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora | 25 |
| 5.1.1 Publikacje | 25 |
| 5.1.2 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników | 25 |
| 5.2 Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora..... | 26 |
| 5.2.1 Publikacje | 26 |
| 5.2.2 Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora | 27 |
| 5.2.2.1 Heteroplazmia, rekombinacja i ewolucja genomu mitochondrialnego Phaseolus vulgaris. | 28 |
| 5.2.2.2 Regulacja roślinnych H ⁺ -ATPaz zlokalizowanych w błonie plazmatycznej Nicotiana glauca za pomocą fosforylacji treoniny i wiązania białek 14-3-3.... | 30 |
| 5.2.2.3 Regulacja wyciszania genu Rps10 u Arabidopsis thaliana. | 30 |
| 5.2.2.4 Epigenetyczna kontrola ekspresji genów w regulacji wzrostu i rozwoju roślin. 30 | |

| | |
|---|----|
| 6. Plany kontynuacji pracy naukowej | 33 |
| 7. Literatura | 34 |

1. Imię i nazwisko

Magdalena Wołoszyńska

2. Posiadane dyplomy i stopnie naukowe

1999 doktor w dziedzinie nauk biologicznych w zakresie biochemii, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, praca pt.: „Heteroplazmia u fasoli zwykłej – geneza i zmienność”

Promotorem pracy doktorskiej była dr hab. Hanna Jańska, recenzentami: prof. dr hab. Halina Augustyniak i prof. dr hab. Stanisław Ułaszewski.

1994 magister biotechnologii, Uniwersytet Wrocławski, Wydział Nauk Przyrodniczych, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, praca pt.: „Molecular analysis of histone and histone-like proteins from soybean root nodules”. Część eksperymentalna pracy została wykonana na Uniwersytecie w Aarhus w Danii (Laboratory of Gene Expression, Department of Molecular Biology) pod kierunkiem dr. Erika Østergaarda Jensena. Praca została napisana w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem dr Hanny Jańskiej.

3. Informacje o dotychczasowym zatrudnieniu w jednostkach naukowych

| | |
|------------------------------------|---|
| od października 2017 | adiunkt, Katedra Genetyki, Wydział Biologii i Hodowli Zwierząt, Uniwersytet Przyrodniczy we Wrocławiu |
| październik 2010 – grudzień 2015* | postdoc, VIB Department of Plant Systems Biology, Ghent University, Belgium |
| październik 2002 – wrzesień 2010** | adiunkt, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski |
| październik 2000 – wrzesień 2002* | postdoc, Physiological Biochemistry Unit, Catholic University of Louvain, Louvain-la-Neuve, Belgium |
| lutym 2000 – wrzesień 2000 | adiunkt, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski |
| styczeń 1994 – styczeń 2000 | Pracownik naukowo-techniczny, Instytut Biochemii i Biologii Molekularnej, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski (od października 1997 do września 1999 na studiach doktoranckich) |

* w latach 1994 - 2013 roku byłam zatrudniona na Uniwersytecie Wrocławskim - na czas staży zagranicznych otrzymywałam urlopy naukowe.

**od grudnia 2009 roku do września 2010 roku byłam na urlopie macierzyńskim i wychowawczym

4. Osiągnięcie naukowe będące podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego

4.1 Tytuł osiągnięcia naukowego

Epigenetyczna regulacja ekspresji genów u roślin

Powyzsze osiągnięcie naukowe zostało udokumentowane w formie cyklu publikacji wymienionych poniżej. Kopie publikacji wchodzących w skład osiągnięcia naukowego zawarte są w Załączniku 4, a oświadczenia współautorów publikacji stanowią Załącznik 5.

4.2 Publikacje

Prace oryginalne

1. Himanen K, **Woloszynska M**, Boccardi TM, De Groeve S, Nelissen H, Bruno L, Vuylsteke M, Van Lijsebettens M. 2012 Histone H2B monoubiquitination is required to reach maximal transcript levels of circadian clock genes in Arabidopsis. **Plant J.**72(2):249-60. **IF 6,582**, punktacja MNiSW 45
2. Schmidt M, Van Bel M, **Woloszynska M**, Slabbinck B, Martens C, Coppens F, De Bloc M and Van Lijsebettens M. 2017 Plant-RRBS, a bisulfite and next-generation sequencing-based methylome profiling method enriching for coverage of methylated cytosine positions. **BMC Plant Biology**, 17(1):115, **IF 3,964**, punktacja MNiSW 40
3. **Woloszynska M**, Gagliardi O, Vandenbussche F, De Groeve S, Alonso Baez L, Neyt P, Le Gall S, Fung J, Mas P, Van Der Straeten D and Van Lijsebettens M. 2018 Elongator regulates hypocotyl growth in darkness and during photomorphogenesis. **Journal of Cell Science**, 131(2), **IF 4.431** (IF z roku 2017), punktacja MNiSW 35. Tej publikacji towarzyszy wywiad z pierwszym autorem, który ukazał się w tym samym numerze.
4. **Woloszynska M**, Gagliardi O., Vandenbussche F, Van Lijsebettens M. 2018 Elongator promotes germination and early postgermination growth. **Plant Signal Behav.**, 13(1)

Praca przeglądowa

5. **Woloszynska M**, Le Gall S, Van Lijsebettens M. 2016 Plant Elongator-mediated transcriptional control in a chromatin and epigenetic context. *Biochim Biophys Acta – Gene Regulatory Mechanisms*.1859(8), 1025-1033. **IF 5.018**, punktacja MNiSW 40

4.3 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników

4.3.1 Wprowadzenie

Biologia molekularna wzbudziła moje zainteresowanie nie tylko jako wyzwanie naukowe i intelektualne, ale również ze względu na moją pasję do pracy eksperymentalnej. DNA, struktura genomu i ekspresja genów u roślin oraz optymalizacja nowych technik badawczych znajdowały się zawsze w centrum moich zainteresowań. W październiku 2010 roku, rozpoczęłam pracę w zespole „Chromatyna i wzrost” prowadzonym przez prof. Mieke Van Lijsebettens w Centrum Biologii Systemowej Roślin Flamandzkiego Instytutu Biotechnologii (VIB) w Gandawie w Belgii. Projekty, którymi zajmowałam się podczas pobytu w VIB pozwoliły mi poznać nową dla mnie dziedzinę biologii molekularnej - epigenetykę. Prowadziłam badania nad modyfikacjami chromatyny, poznałam nowe rośliny modelowe: *Arabidopsis thaliana* i ryż i miałam szansę rozwijania mojej pasji do pracy eksperymentalnej wprowadzając i optymalizując techniki immunoprecypitacji chromatyny (ang. chromatin Immunoprecipitation, CHIP), immunoprecypitacji metylowanego DNA (ang. methylated DNA immunoprecipitation, MeDIP) i sekwencjonowania DNA o zredukowanej reprezentacji po reakcji z wodorosiarczynem (reduced representation bisulfite sequencing, RRBS). Moja praca dotyczyła modyfikacji histonów - ich acetylacji przez kompleks Elongator i monoubikwitynacji przez kompleks HUB1/HUB2 oraz metylacji DNA. Podczas gdy badania skoncentrowane na modyfikacjach histonów zmierzały do wyjaśnienia molekularnych podstaw i konsekwencji fizjologicznych tych regulacji epigenetycznych, prace dotyczące metylacji DNA były poświęcone wprowadzeniu i dostosowaniu do modelu roślinnego metod umożliwiających profilowanie genomu lub analizę ukierunkowaną na gen. Ostatecznie jednak celem łączącym wszystkie moje badania było poznawanie **epigenetycznej regulacji ekspresji genów u roślin**.

Aby pozwolić czytelnikowi lepiej zrozumieć cele mojej pracy i uzyskane rezultaty, zacznę autoreferat od wprowadzenia do ogólnych zagadnień epigenetyki, a następnie przedstawię te jej aspekty, które są bezpośrednio związane z moją pracą: acetylację i monoubikwitynację histonów oraz metylację DNA. Zaprezentuję stan badań w tej dziedzinie z naciskiem na geny będące celem tych modyfikacji epigenetycznych, powodujące je czynniki rozwojowe i środowiskowe oraz regulowane przez nie procesy. W szczególności przedstawię Elongator i kompleks HUB1/HUB2 oraz odgrywane przez nie role w regulacji ekspresji genów.

4.3.2 Stan wiedzy

W połowie lat 40. Waddington po raz pierwszy zaproponował termin **epigenetyka** w odniesieniu do badań nad „interakcjami między genami a ich produktami, które przyczyniają się do pojawienia się fenotypu” (Waddington, 1968). Przez lata znaczenie słowa „epigenetyka” ewoluowało i od roku 1990 jest używane jako nazwa tej gałęzi biologii molekularnej, która bada

mitotycznie lub mejotycznie przekazywane modyfikacje materiału genetycznego, które mogą wpływać na aktywność genów, ale pozostawiają nienaruszoną pierwszorzędową strukturę DNA. Do epigenetyki należą badania nad modyfikacjami DNA lub histonów, wariantami histonów, remodelowaniem chromatyny, składaniem nukleosomów i kierowanymi przez niekodujące cząsteczki RNA procesami związanymi z transkrypcją. Wszystkie te mechanizmy wspólnie kształtują konformację chromatyny i tworzą epigenetyczną (kodowaną ponad sekwencją nukleotydową) informację określającą transkrypcyjną aktywność genów. Sygnały uruchamiające modyfikacje chromatyny, enzymy zaangażowane we wprowadzanie lub odczytywanie tych zmian, regulowane w ten sposób szlaki metaboliczne oraz fizjologiczne i fenotypowe konsekwencje tych regulacji znajdują się w zasięgu zainteresowań epigenetyki. Cieszące się obecnie największym zainteresowaniem zagadnienia epigenetyki roślin dotyczą powodowanych przez wpływ środowiska modyfikacji chromatyny, ich dziedziczenia i stabilnego przekazywania kolejnym pokoleniom oraz aspektów adaptacyjnych i ewolucyjnych. Udział mechanizmów epigenetycznych w zmienności fenotypowej roślin i potencjał wykorzystania tej plastyczności w udoskonalaniu roślin wywołały duże zainteresowanie epigenetyką. Opracowano metody pozwalające na ukierunkowaną na gen analizę modyfikacji epigenetycznych oraz techniki przeznaczone do badań profilowanych lub w skali całego genomu.

4.3.2.1 Znaki epigenetyczne

W komórkach eukariotycznych DNA oddziałuje z histonami – białkami, które chronią, ale też organizują informację genetyczną czyniąc ją dostępną dla replikacji DNA, transkrypcji lub naprawy genomu zgodnie z programem rozwojowym organizmu lub pod wpływem czynników zewnętrznych. Ta wysoce dynamiczna struktura to chromatyna, a jej podstawowe jednostki – nukleosomy, zbudowane z fragmentów DNA o długości 146 pz owiniętych wokół oktameru histonów (dwóch kopii histonów H2A, H2B, H3 i H4) i stabilizowanych przez histon H1, są upakowane w bardziej skondensowane struktury. Zarówno histony, jak i DNA są obiektami kowalencyjnych modyfikacji chemicznych zwanych znakami epigenetycznymi.

Modyfikacje histonów

Posttranslacyjne modyfikacje histonów to acetylacja, ubikwitynacja, metylacja, fosforylacja i SUMOilacja specyficznych reszt aminokwasowych zlokalizowanych zazwyczaj w łatwo dostępnych N-końcowych ogonach histonów. Modyfikacje te mogą bezpośrednio wpływać na interakcje histonów i DNA lub jako kombinacja tworzyć kod histonowy lub sygnaturę odczytywaną przez białka wiążące się do chromatyny, które razem z kompleksami efektorowymi interpretują sygnał i remodelują chromatynę.

Acetylacja histonów

Acetylacja konserwowanych reszt lizyny w N-końcowych ogonach histonowych neutralizuje pozytywny ładunek lizyn minimalizując przyciąganie między histonami a obdarzonym

ładunkiem negatywnym DNA i prowadząc do bardziej otwartej i rozluźnionej konformacji chromatyny (Shahbazian and Grunstein, 2007), co ułatwia ekspresję genów. Deacetylacja reszt lizyny czyni chromatynę bardziej upakowaną prowadząc do wyciszenia genów (Berger, 2007). Poziom acetylacji histonów jest kształtowany przez acetylotransferazy histonowe (ang. histone acetyltransferases HAT) i deacetylazy histonowe (ang. histone deacetylases, HDAC). U *Arabidopsis*, enzymy HAT są podzielone na cztery rodziny na podstawie homologii sekwencji i/lub sposobu działania. Najlepiej scharakteryzowana jest rodzina GNAT (ang. General control nondepressible 5 (GCN5)-related N-Acetyl Transferase), znana też jako rodzina HAG (ang. HATs of the GNAT) i reprezentowana przez trzy enzymy: HAG1 lub GCN5, HAG2, i HAG3 lub ELP3, czyli trzecią podjednostkę kompleksu Elongator.

Acetylcja histonów podczas wzrostu i rozwoju roślin oraz w odpowiedzi na wpływ środowiska

Acetylcja i deacetylcja reszt lizyny w histonach zależy od kluczowych metabolitów, odpowiednio - acetylo-CoA i NAD⁺, co sugeruje, że epigenetycznie regulowana ekspresja genów jest bezpośrednio skoordynowana z metabolizmem pierwotnym regulującym w ten sposób wzrost i rozwój roślin (Shen i wsp., 2015, praca przeglądowa). Odwracalna i kontrolowana acetylcja histonów pozwala realizować genetycznie zaprojektowany program rozwojowy i reagować na wpływ środowiska. Regulacja ekspresji genów przez acetylcję histonów rozpoczyna się już w nasionach, jest kontynuowana podczas rozwoju wegetatywnego, wzrostu i kwitnienia, ale z drugiej strony pośredniczy w odpowiedzi na stres biotyczny i abiotyczny oraz w naprawie DNA (Wang i wsp., 2014, praca przeglądowa). Prawidłowy poziom acetylacji histonów jest kluczowy dla rozwoju **nasion**, ich dojrzewania, spoczynku, kiełkowania i embriogenezy u *Arabidopsis*, ryżu i kukurydzy (Aiese-Cigliano i wsp., 2013; Colville i wsp., 2011; Tanaka i wsp., 2008; Wang i wsp., 2013; Wu i wsp., 2000; Yano i wsp., 2013; Zhou i wsp. 2013). Podczas **rozwoju wegetatywnego i wzrostu** HAT regulują funkcje merystemów, różnicowanie komórek, wydłużanie pędu i organogenezę liści (Barra i wsp., 2012; Servet i wsp., 2010), podczas gdy deacetylazy histonów biorą udział w regulacji długości korzenia i pędu głównego, rozwoju liści i tempa wzrostu roślin (Aiese-Cigliano i wsp., 2013; Kidner and Martienssen, 2004; Tian i wsp., 2003, 2005; Tian and Chen, 2001; Ueno i wsp., 2007). Acetylcja histonów pośredniczy w regulacji rozwoju **kwiatów**, gametogenezy i czasu kwitnienia (Wang i wsp., 2014, praca przeglądowa). **Światło** należy do najsilniejszych regulatorów acetylacji histonów powodując zmiany w poziomie ekspresji genów, których efektem jest morfologiczna odpowiedź roślin na światło. Mutacje w genach kodujących GCN5 i HAF2 prowadzą do fenotypów zmniejszonej wrażliwości na światło o wydłużonych hipokotylach siewek i zmniejszonej ekspresji genów indukowanych przez światło. Obie HAT regulują aktywność czynnika transkrypcyjnego HY5 (ang. ELONGATED HYPOCOTYL 5) – głównego pozytywnego regulatora procesu inhibicji wydłużania hipokotyli.

4.3.2.2 Elongator – kompleks białkowy acetylujący histony podczas elongacji transkrypcji

Elongator to kompleks białkowy konserwowany u drożdży, zwierząt i roślin, który oddziałuje z RNA Polimerazą II (RNAPII) ułatwiając transkrypcję genów przez acetylację histonów. Elongator reguluje transkrypcję genów kodujących białka oraz transkrypcję i procesowanie microRNA (miRNA). Elongator posiada również aktywność (de)metylacji DNA i jest zaangażowany w modyfikację urydyny w tRNA w pozycji wahadłowej (Wołoszynska i wsp., 2016, praca przeglądowa). Kompleks holo-Elongatora składa się z części korowej zawierającej podjednostki Elp1-3 i części pomocniczej (Elp4-6) (Krogan i wsp., 2001). **Elp3** zawiera C-końcową domenę acetylotransferazy histonowej (HAT), która należy do rodziny GNAT (Pandey i wsp., 2002). *In vivo* Elongator acetyluje tylko lizynę 14 histonu H3 i lizynę 8 histonu H4 (Winkler i wsp., 2002; Hawkes i wsp., 2002). Wielokrotnie wykazano, że u roślin posiadających mutacje w podjednostkach Elongatora (mutanty ***elongata***, ***elo***) obniżona acetylacja histonów w obszarach kodujących genów jest skorelowana z niższą ekspresją tych genów (Wołoszynska i wsp., 2016, praca przeglądowa), co przemawia za rolą Elongatora jako czynnika elongacji transkrypcji u roślin. Co więcej, zidentyfikowano interakcje genetyczne oraz bezpośrednie między Elongatorem a czynnikami inicjacji (MEDIATOR, Nelissen i wsp., 2003) lub elongacji (SUPPRESSOR of Ty4, Dürr i wsp., 2014) transkrypcji oraz MINIYO (IYO, a RNAPII-associated protein 1 homolog, Sanmartín i wsp., 2011). Potwierdzono również jądrową lokalizację Elongatora i jego asocjacje z euchromatyną (Nelissen et al., 2010). Mutanty *elo Arabidopsis* posiadają wydłużone i wąskie liście, krótkie korzenie główne, mniejszą liczbę korzeni bocznych (Nelissen i wsp., 2005, 2007, 2010), są wrażliwe na kwas abscysynowy (ABA), odporne na suszę (Chen i wsp., 2006) i stres oksydacyjny i akumulują antocyjany (Zhou i wsp., 2009). Fenotypy mutantów pozwoliły odkryć rolę Elongatora w rozwoju liści (Falcone i wsp., 2007; Kojima i wsp., 2011, Xu i wsp., 2012) i cyklu komórkowym (Skylar i wsp., 2013). Dodatkowe analizy fenotypowe wykazały, że Elongator reguluje przejście komórek do stadium różnicowania się w merystemie apikalnym pędu (Sanmartín i wsp., 2011), rozwój regulowany przez auksyny – stopień złożoności nerwacji liści, filotaksję i dominację apikalną (Nelissen i wsp., 2010), odpowiedź na auksyny (Leitner i wsp., 2015), odpowiedź immunologiczną (DeFraia i wsp., 2010, 2013; Wang i wsp., 2013), i odporność na patogeny grzybowe (Wang i wsp., 2015). Zgodnie z rolą pełnioną przez Elongator podczas wzrostu, eksperymenty wykorzystujące hybrydyzację *in situ* wykazały, że geny *ELO* ulegają ekspresji w tkankach merystematycznych i ulegających podziałom (Nelissen i wsp., 2010). Reasumując, fenotypy mutantów i analiza ekspresji genów *ELO* wskazują, że **Elongator jest u roślin zaangażowany we wzrost, rozwój, sygnalizację auksynową, odpowiedź immunologiczną i odpowiedź na stres abiotyczny.**

4.3.2.3 Monoubikwitynacja histonów i kompleks HUB1/HUB2

Ubikwityna (Ub) jest białkiem modyfikującym przyłączanym kowalencyjnie do innych białek na drodze koniugacji jej C-terminalnej reszty do reszty lizyny białka akceptorowego. Ubikwitynacja przebiega w trzech etapach: zależnej od ATP aktywacji przez enzym E1, koniugacji do enzymu E2 i przeniesienia na lizynę w białku akceptorowym przez ligazę E3. Monoubikwitynacji ulegają histony H2A i H2B, co powoduje odpowiednio represję i aktywację transkrypcji. W *Arabidopsis* monoubikwitynacja histonu H2B następuje na konserwowanej reszcie lizyny H2BK143, jest obecna w całym genomie i współdziała z metylacjami histonu H3: H3K4me3 i/lub H3K36me3 powodując aktywację genów (Roudier i wsp., 2011).

W roślinach dwie ligazy E3 – **HUB1** i **HUB2**, tworzą heterotetrameryczny kompleks, który prowadzi monoubikwitynację histonów H2B (H2Bub) (Fleury i wsp., 2007; Liu i wsp., 2007). U *Arabidopsis* aktywność koniugującą enzymu E2 posiadają dwa białka – AtUBC1 i AtUBC2, które wraz z HUB1 i HUB2 są konieczne dla H2Bub i **transkrypcyjnej aktywacji wielu genów i szlaków sygnałowych związanych z kwitnieniem, cyklem komórkowym, spoczynkiem nasion, fotomorfogenezą i obroną przed patogenami** (Fleury i wsp., 2007; Liu i wsp., 2007; Cao i wsp., 2008; Dhawan i wsp., 2009; Bourbousse i wsp., 2012). Silne obniżenie poziomu monoubikwitynacji histonów H2B w mutantach *hub1* i *hub2* koreluje z wcześniejszym kwitnieniem i z regulacją głównych czynników kontrolujących czas kwitnienia w *Arabidopsis*: FLC, MAF4 i MAF5 (Cao i wsp., 2008; Gu i wsp., 2009; Xu i wsp., 2009). Fenotypy związane z brakiem aktywności HUB1 są plejotropowe, ale wydają się być specyficzne dla procesów następujących okresowo lub indukowanych przez bodźce.

4.3.2.4 Metylacja DNA

DNA ulega metylacji kiedy grupa metylowa jest przyłączana do atomu węgla znajdującego się w pozycji piątej w pierścieniu **cytozyny** w DNA. U roślin metylacji ulegają cytozyny znajdujące się w kontekstach sekwencji DNA **CG**, **CHG** i **CHH** (H = A, T or C), a ich poziom metylacji bardzo silnie różni się w zależności od kontekstu i gatunku (Cokus i wsp., 2008; Gent i wsp., 2013; Lister i wsp., 2008; Zhang i wsp., 2006). Metylacja DNA jest regulowana przez trzy szlaki enzymatyczne, w których uczestniczą trzy **metylotransferazy**: szlak RdMD (ang. RNA-Directed DNA Methylation) z metylotransferazą DRM2 (ang. domains rearranged DNA methylase 2), szlak chromometylaz 2 i 3 (CMT2 i 3) oraz szlak, którego zadaniem jest utrzymanie metylacji z metylotransferazą 1 (MET1) (Finnegan i Kovac, 2000). Metylotransferazy odgrywają różne, ale też częściowo nakładające się na siebie role w utrzymaniu metylacji oraz w metylacji *de novo* w różnych kontekstach (Cao i Jacobsen, 2002; Du i wsp., 2012; Schöb i Grossniklaus 2006; Stroud i wsp., 2014). Demetylacja następuje na skutek podziałów komórkowych i „rozcieńczania” istniejących metylacji lub w wyniku aktywnego procesu usuwania grup metylowych przez glikozylazy DNA: ROS1 (Repressor of Silencing 1) i DME (Demeter).

Metylacja DNA ma różne konsekwencje dla transkrypcji genów w zależności od lokalizacji i kontekstu. U *Arabidopsis* intensywna **metylacja we wszystkich kontekstach inhibuje transkrypcję jeśli dotyczy promotorów i miejsc początku transkrypcji wyciszonych genów i nieaktywnych transpozonów** (Saze i wsp., 2012). Metylacja promotorów jest wykrywana w genach o obniżonym poziomie ekspresji (Cubas I wsp., 1999, Jacobsen i Meyerowitz, 1997; Manning i wsp., 2006), podczas gdy demetylacji cytozyny towarzyszy aktywacja transkrypcji (Xie i wsp., 2015) lub retrotranspozycji (Liu i wsp., 2004). W sekwencjach powtórzonych metylacja cytozyny we wszystkich trzech kontekstach obniża transkrypcję i rozprzestrzenia się elementów ulegających transpozycji (TE) i dlatego jest uważana za sposób obrony przed szkodliwymi mutacjami powodowanymi przez insercje TE. Z drugiej strony, metylacja powtórzeń DNA może rozprzestrzeniać się do sąsiadujących genów i regulować ich ekspresję. Dlatego intensywność metylacji TE jest najprawdopodobniej utrzymywana na poziomie zapewniającym równowagę między korzyściami a szkodami mogącymi wynikać z wyciszania genów. Aktywnie transkrybowane geny są także celami wewnątrzgenowej metylacji - albo w intronach we wszystkich kontekstach, co powoduje powstanie wysp wyciszonej chromatyny, albo tylko w kontekście CG w sekwencji kodującej genu w przypadku genów ulegających ekspresji konstytucyjnej, w których metylacja nie jest niezbędna dla regulacji transkrypcji (To i wsp., 2015; Bewick i wsp., 2016). Rola metylacji w obrębie sekwencji kodującej genu nie jest poznana, ale metylowane w ten sposób geny są dłuższe, pełnią ważne funkcje i ewoluują wolno, a status ich metylacji jest wysoce konserwowany (Takuno i wsp., 2012).

U wielu gatunków roślin **zmiany w poziomie metylacji specyficznych sekwencji DNA są indukowane przez stres biotyczny i abiotyczny** powodując zmienioną ekspresję genów związanych z odpowiedzią na stres, obroną i adaptacją (Elhamamsy, praca przeglądowa 2016). Spontaniczne zmiany w metylacji DNA (**epimutacje**) przyczyniają się do dziedzicznej zmienności fenotypowej (Becker i wsp., 2011; Schmitz i wsp., 2011). **Epiallele** są wariantami genów wyróżniającymi się znakami epigenetycznymi, które regulują ekspresję genów i są stabilnie przekazywane z pokolenia na pokolenie. Kilka spośród znanych naturalnie występujących epialleli ma związek z fenotypami o istotnym znaczeniu dla rolnictwa. Powstanie odmiany pomidora produkującej bladeżółte („bezbarwne”) owoce (ang. *Colorless non-ripening*, *Cnr*) jest związane z hipermetylacją w promotorze genu kodującego czynnik transkrypcyjny regulujący geny związane z dojrzewaniem owoców (Manning i wsp., 2006). Epiallele *Epi-d1*, *Epi-df* and *Epi-rav6* ryżu są związane z poważnymi zmianami w morfologii (Miura i wsp. 2009). Metylacje DNA i modyfikacje histonów w genie kodującym białko typu SBP (squamosa promoter binding protein (SBP)-like) u ryżu są skorelowane z liczbą nasion w kłosach (Miura i wsp. 2010). Fenotypy charakteryzujące się zmienionym czasem kwitnienia i długością pędu, które są skorelowane ze zmienioną metylacją cytozyny były stabilnie

dziedziczone w liniach *Arabidopsis* wyprowadzonych z krzyżówki między roślinami typu dzikiego i mutantem *ddm1* (ang. nucleosome remodeler mutant) (Johannes i wsp., 2009). Linie epigenetyczne (ang. epilines) rzepaku (*Brassica napus*) posiadały różne sygnatury epigenetyczne gdy analizowano ogólny poziom metylacji cytozyny, metylacji histonów H3 i acetylacji histonów H4 i wykazywały podwyższoną tolerancję na stres suszy, która pozostawała stabilna przez przynajmniej siedem pokoleń (Hauben i wsp., 2009; Verkest i wsp., 2015).

Efekty regulacji epigenetycznej są niewielkie w porównaniu z tymi powodowanymi przez zmienność genetyczną (Meng i wsp., 2016), ale ogólne tempo epimutacji jest o wiele wyższe niż tempo mutacji genetycznych (Charlesworth i Jain, 2014; Furrow, 2014). Różnorodność epigenetyczna wpływająca na złożone cech adaptacyjne powstaje w odpowiedzi na czynniki środowiskowe i może nagromadzać się szybko w zmieniającym się środowisku aby uzyskać równowagę populacyjną w ciągu życia mniej niż dwunastu pokoleń (Slatkin, 2009). Dlatego zabiegi hodowlane uwzględniające czynniki epigenetyczne (ang. epigenetic breeding) wydają się być bardzo atrakcyjnym sposobem ulepszania cech o złożonym podłożu genetycznym, takich jak tolerancja na stres i stabilna wydajność u wielu gatunków roślin, u których zmiany ekspresji genów towarzyszą wielu epiallelom. Prowadzenie tego typu hodowli wymaga zastosowania wysokoprzepustowych metod detekcji metylacji cytozyny, które ułatwiłyby identyfikację osobników posiadających interesujące epiallele.

4.3.3 Cel badań

Głównym celem moich badań było zrozumienie mechanizmów i zaproponowanie narzędzi do analizy epigenetycznej regulacji ekspresji genów u roślin. W efekcie zostały zidentyfikowane geny regulowane przez białkowe kompleksy dokonujące acetylacji (Elongator) lub monoubikwitynacji (HUB1/HUB2) histonów, dzięki czemu możliwe było wyjaśnienie roli jaką Elongator pełni w czasie kiełkowania oraz skoto- i fotomorfogenezy oraz przez HUB1 w ekspresji genów zegara okołodobowego. Opracowana została również wydajna metoda profilowania metylacji genomu plant-RRBS (ang. plant-Reduced Representation Bisulfite Sequencing). Dowodem przydatności tej metody stało się jej zastosowanie do wykrycia cytozyn różniących się poziomem metylacji w linii hodowlanej ryżu *Oryza sativa ssp. indica* i wyprowadzonej z niej epilinii.

4.3.4 Uzyskane wyniki

4.3.4.1 Elongator reguluje kiełkowanie, wczesny wzrost i rozwój hipokotyli w ciemności oraz podczas fotomorfogenezy

Kiedy po raz pierwszy spotkałam prof. Mieke Van Lijsebettens w 2010 roku, prowadzona przez nią grupa badawcza właśnie opublikowała artykuł opisujący rolę Elongatora w regulacji genów związanych z działaniem auksyn u *Arabidopsis thaliana* (Nelissen i wsp., 2010). Dlatego

niezwykle interesujące wydały mi się badania nad Elongatorem, który uczestniczy zarówno w jednym z najbardziej podstawowych procesów molekularnych jakim jest transkrypcja, a z drugiej strony jest niezbędny dla tak różnorodnych funkcji życiowych roślin jak wzrost, rozwój i odpowiedź na bodźce abiotyczne. Elongator stał się dla mnie jeszcze bardziej interesujący, kiedy zobaczyłam nieopublikowane wyniki uzyskane przez doktoranta Stevena De Groeve, który zaobserwował bardzo ciekawe fenotypy rosnących w świetle i w ciemności siewek mutantu *elo3-6* posiadających mutację w genie podjednostki trzeciej ELP3 Elongatora. Dlatego we współpracy z prof. Van Lijsebettens napisałam projekt, którego celem było wyjaśnienie roli Elongatora podczas rozwoju siewek *Arabidopsis* rosnących w świetle lub w ciemności. Projekt został zrealizowany dzięki stypendium Marie Curie Intra-European Fellowship.

Najważniejsze wyniki uzyskane w wyniku realizacji tego projektu zostały opublikowane w czasopiśmie *Journal of Cell Science* (Woloszynska et al., 2018a), podczas gdy mniejsza publikacja zawierająca wyniki związane z kiełkowaniem nasion i wczesnym wzrostem siewek (Woloszynska et al., 2018b) ukazała się w *Plant Signaling & Behavior*. Te dwa artykuły oryginalne zostały poprzedzone publikacją pracy przeglądowej, która ukazała się ponad rok wcześniej w *Biochimica and Biophysica Acta* (Woloszynska i wsp., 2016).

Celem publikacji przeglądowej było nie tylko podsumowanie stanu wiedzy na temat Elongatora, ale również przedstawienie nowych analiz bioinformatycznych dotyczących ekspresji genów *ELP* oraz sieci oddziaływań białek ELP. Meta-analiza transkrypcyjna uzyskana przy zastosowaniu bazy danych Genevestigator (Zimmermann i wsp., 2004) wykazała, że geny wszystkich sześciu podjednostek Elongatora są aktywne na wszystkich stadiach rozwojowych. Większość analizowanych czynników wpływało na ekspresję wszystkich genów ELP w ten sam sposób. Stymulujący wpływ potwierdzono dla auksyn, kwasu abscysynowego i suszy, podczas gdy stresi wysokiego stężenia soli, światła o wysokim natężeniu, temperaturowy, niskiego pH i niedoboru siarki zostały zidentyfikowane jako nowe czynniki. Podsumowując, meta-analiza transkrypcyjna wskazała na sygnalizację auksynową, odpowiedź immunologiczną i stres abiotyczny jako na procesy regulowane przez Elongator. Sieć interakcji białek ELP z innymi białkami uzyskano stosując program *Arabidopsis thaliana* Protein Interaction Network (AtPIN), który wyselekcjonował 26 przypuszczalnych interaktorów roślinnego Elongatora. Te białka są występującymi u *Arabidopsis* ortologami białek drożdży, człowieka, muszki owocowej lub bakterii, dla których wykazano oddziaływania z podjednostkami ELP stosując różne metody detekcji kompleksów białkowych lub metody biochemiczne. Biorąc pod uwagę rolę jaką Elongator odgrywa podczas elongacji transkrypcji, szczególnie interesujące było odkrycie wśród oddziałujących z nim białek, pięciu podjednostek RNA polimerazy II i podjednostek głównego czynnika transkrypcyjnego TFIID. Dodatkowa aktywność Elongatora podczas wymiany wariantów histonów została zasugerowana przez

obecność białka ATSWC4 biorącego udział w tym procesie lub HTA9 – jednego z wariantów histonu H2A.Z. Pozostałe interaktory białkowe Elongatora wskazywały na jego udział w składaniu eksonów lub biogenezie małych cząsteczek RNA. Sieć interakcji Elongatora uzyskana za pomocą programu AtPIN wskazuje zatem, że Elongator jest regulatorem procesów jądrowych związanych z epigenetyczną i/lub odbywającą się na poziomie chromatyny kontrolą ekspresji genów.

Praca przeglądowa stała się wstępem do **głównego artykułu** opisującego rolę Elongatora w regulacji wzrostu hipokotyli w ciemności i podczas fotomorfogenezy (Wołoszynska i wsp., 2018a). Po kiełkowaniu, siewki roślin ciągle znajdujące się pod powierzchnią ziemi, rozwijają się w ciemności według programu rozwojowego skotomorfogenezy, zgodnie z którym hipokotyle wydłużają się (etiologia), a ich końce z zamkniętymi liścieniami są zagięte. Kiedy siewki przebiją powierzchnię ziemi i znajdą się na świetle, program rozwojowy zmienia się na fotomorfogenezę, co powoduje deetiologię, podczas której wydłużanie hipokotyli ulega zahamowaniu, hipokotyle prostują się, a liścienie zaczynają się otwierać. Wąskie, wydłużone i hiponastyczne liście i petiole mutantów *elo* przypominające liście mutantów fotoreceptorów, zasugerowały, że Elongator może odgrywać ważną rolę w odpowiedzi roślin na światło. Dlatego badaliśmy udział Elongatora we wczesnym rozwoju roślin *Arabidopsis* w ciemności lub na świetle (odpowiednio podczas etiologii i deetiologii) oceniając długość hipokotyli i ich zagięcie – dwie cechy charakteryzujące wzrost siewek i odróżniające programy skoto- i fotomorfogenezy. Rosnące w ciemności siewki *elo* mają krótsze hipokotyle niż siewki typu dzikiego Col-0, ale liścienie i zagięcie hipokotyli są bardzo podobne, co wskazuje że **mutacja *elo* zaburza jedynie wzrost hipokotyli w ciemności**. Siewki *elo* rosnące w świetle czerwonym, dalekiej czerwieni i niebieskim wykazują zaburzoną deetiologię, co jest widoczne jako dłuższe hipokotyle, ograniczone otwieranie liścieni i ich hiponastyczny wzrost wskazując, że **mutanty *elo* posiadają zmniejszoną wrażliwość na wszystkie testowane rodzaje światła**. Wyniki były podobne dla mutantów odpowiadających różnym podjednostkom Elongatora, co sugeruje, że w *Arabidopsis* **Elongator jako cały kompleks reguluje wydłużanie hipokotyli w ciemności i w świetle o różnej długości fali**.

Analiza podwójnych mutantów wykazała, że **Elongator jest konieczny dla wydłużania hipokotyli w warunkach stymulujących szybki wzrost** – takich jak ciemność lub brak aktywnych fotochromów A lub B. Ponadto, Elongator wspiera wydłużanie hipokotyli za pośrednictwem mechanizmu stymulującego wzrost, dodatkowego lub innego niż szlak czynników PIF (ang. Phytochrome interacting factors, pozytywnie regulujących skotomorfogenezę). W świetle, Elongator promuje zahamowanie wzrostu hipokotyli działając w świetle dalekiej czerwieni przez szlak oddziałujący z czynnikiem HFR1 (ang. Elongated hypocotyl in far-red, pozytywny regulator fotomorfogenezy).

Najlepiej poznaną u roślin rolę Elongatora jest regulacja transkrypcji, dlatego analizowaliśmy transkryptomy siewek mutantu *elo3-6* rosnącego w ciemności stosując mikromacierze. Geny, których ekspresja była wyższa u mutantu niż u roślin typu dzikiego należały do kategorii ontologicznych, które odpowiadają **profilom transkrypcyjnym typowym dla odpowiedzi roślin na atak patogenów** (Rojas i wsp., 2014), kiedy aktywowane są geny związane z obroną i głównymi szlakami metabolizmu, w tym z produkcją energii lub syntezą cząsteczek sygnałowych. Takie zmiany transkryptomu powodują obniżenie zasobów energii, które jest kompensowane przez zmniejszenie poziomu ekspresji genów innych szlaków metabolicznych, prowadzące do spowolnienia wzrostu, co można zaobserwować u mutantów *elo* w ciemności. I rzeczywiście – **analizując kategorie ontologiczne genów o ekspresji obniżonej u mutantu *elo*, byliśmy w stanie odtworzyć sieć kontrolującą wzrost, na którą składały się cztery główne centra: zegar okołodobowy, regulatory skoto- i fotomorfogenezy, różne szlaki odpowiedzi hormonalnej oraz biosynteza pierwotnej i wtórnej ściany komórkowej.**

Geny o obniżonej ekspresji kodowały zarówno główne pozytywne regulatory, jak i bezpośrednie efekторы wzrostu, co jest zgodne z opóźnieniem wydłużania hipokotyli widocznym w przypadku siewek mutantów *elo* rosnących w ciemności. Udział wszystkich czterech centrów regulacji wzrostu w fenotypie mutantu *elo* był oceniany poprzez analizę odpowiednich mutantów, zastosowanie konstruktów z genami reporterowymi oraz testy wzrostu hipokotyli w obecności substancji wpływających na ich wzrost.

Hipokotyle rosnących w ciemności roślin z mutacjami w genach kodujących dwa główne białka zegara okołodobowego: *CCA1* (ang. *CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1*) i *LHY* (*LATE ELONGATED HYPOCOTYL*) były podobne do hipokotyli mutantów *elo*. W dobowych profilach ekspresji genów *CCA1* i *LHY* akumulacja mRNA była wyraźnie zredukowana u mutantu *elo3-6*. Ten wynik został potwierdzony przez pomiary bioluminescencji linii reporterowych z ekspresją genu lucyferazy połączonego z promotorami genów *CCA1* lub *LHY* w mutancie *elo3-6*. Wskazuje to, że **funkcje pełnione przez *ELO3* są ważne dla zachowania właściwej amplitudy ekspresji genów *CCA1* i *LHY* i że funkcjonowanie zegara okołodobowego zaburzone przez niewłaściwą ekspresję składników zegara może przyczyniać się do fenotypu hipokotyli mutantów *elo3*.**

W mutancie *elo3-6* obniżona jest ekspresja genów **pozytywnych regulatorów skotomorfogenezy**, co może prowadzić do redukcji elongacji hipokotyli tak, jak w przypadku roślin z mutacjami w genach tych regulatorów (Gangappa i wsp., 2013; Leivar i wsp., 2012; Nixdorf i Hoecker, 2010). *PIF4* jest najważniejszym z tych czynników i jego obniżona ekspresja w *elo3-6* w ciemności jest zgodna z genetycznymi interakcjami między *PIF4* a Elongatorem obserwowanymi u potrójnego mutantu *elo3-6pif3-3pif4-2*. Rzeczywiście, wiele genów o

ekspresji obniżonej w transkryptomie mutantu *elo3-6* podlega jednocześnie regulacji przez PIF4 (Oh i wsp., 2014).

Zaskakującym wynikiem było stwierdzenie obniżonej ekspresji genów **pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy** *HY5*, *HYH*, *HFR1* i *HY1* w mutancie *elo3-6* w ciemności. Obniżona ekspresja tych regulatorów prowadzi do wydłużenia hipokotyli i zapobiega ich prostowaniu się i rozwijaniu liścieni. Równoczesne obniżenie ekspresji pozytywnych regulatorów zarówno skoto- i fotomorfogenezy w mutancie *elo3-6* najprawdopodobniej prowadzi do wypadkowego fenotypu o umiarkowanie skróconym, ale zagiętym hipokotyli.

Wśród genów związanych z odpowiedzią hormonalną o ekspresji obniżonej w mutancie *elo3-6*, szczególnie dobrze reprezentowane były geny szlaku brasinosteroidów (BR), a profile wrażliwości mutantu *elo3-6* na inhibitor biosyntezy brasinosteroidów i na egzogenny brasinolid są podobne do wrażliwości mutantu *bzr1-1D* z mutacją w genie *BZR1* kluczowym dla odpowiedzi na BR.

Szlaki hormonalne regulują wzrost poprzez wspólne oddziaływanie na biosyntezę ściany komórkowej. W mutancie *elo3-6* rosnącym w ciemności, obniżony poziom ekspresji miało ponad 40 genów związanych z biosyntezą ściany komórkowej, szczególnie wtórnej ściany komórkowej. Co ciekawe, rośliny z mutacjami w niektórych z tych genów, są podobne do *elo3-6* ponieważ również mają umiarkowanie krótsze i zagięte hipokotyle w ciemności (Faik i wsp., 2014).

Analiza wykonana za pomocą immunoprecypitacji chromatyny (ChIP-qPCR) wykazała, że spośród 20 testowanych genów o ekspresji obniżonej w ciemności w mutancie *elo3-6*, jedynie *LHY*, *HYH* i *HFR1* wykazują niższą acetylację histonów, co sugeruje że Elongator uczestniczy w selektywnej epigenetycznej kontroli ekspresji genów kodujących czynniki transkrypcyjne działające na wysokim poziomie regulacji wzrostu. **Identyfikacja genu *LHY* wśród genów regulowanych przez Elongator oraz jego obniżona ekspresja w mutancie *elo3-6* i podobny fenotyp hipokotyli mutantów *lhy* i *elo3-6* w ciemności, wskazują, że epigenetyczna kontrola ekspresji *LHY* przez aktywność HAT Elongatora może przyczyniać się do regulacji wzrostu hipokotyli.** Działająca w ciemności kontrola genów *HYH* i *HFR1* przez Elongator sugeruje istnienie precyzyjnego mechanizmu dostrajania regulacji wzrostu hipokotyli, w którym pozytywne regulatory fotomorfogenezy zapobiegałyby nadmiernemu wydłużaniu.

Aby wyjaśnić rolę Elongatora podczas fotomorfogenezy, transkryptomy siewek *elo3-6* rosnących w świetle czerwonym, dalekiej czerwieni i niebieskim były analizowane za pomocą PCR w czasie rzeczywistym. Stwierdzono obniżony poziom transkrypcji pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy *HY5*, *HYH*, *HFR*, podczas gdy gen pozytywnego regulatora skotomorfogenezy, stymulującego wzrost w ciemności - *PIF4* wykazywał podwyższony poziom transkrypcji. Te zmiany w poziomach transkryptów głównych regulatorów wzrostu i

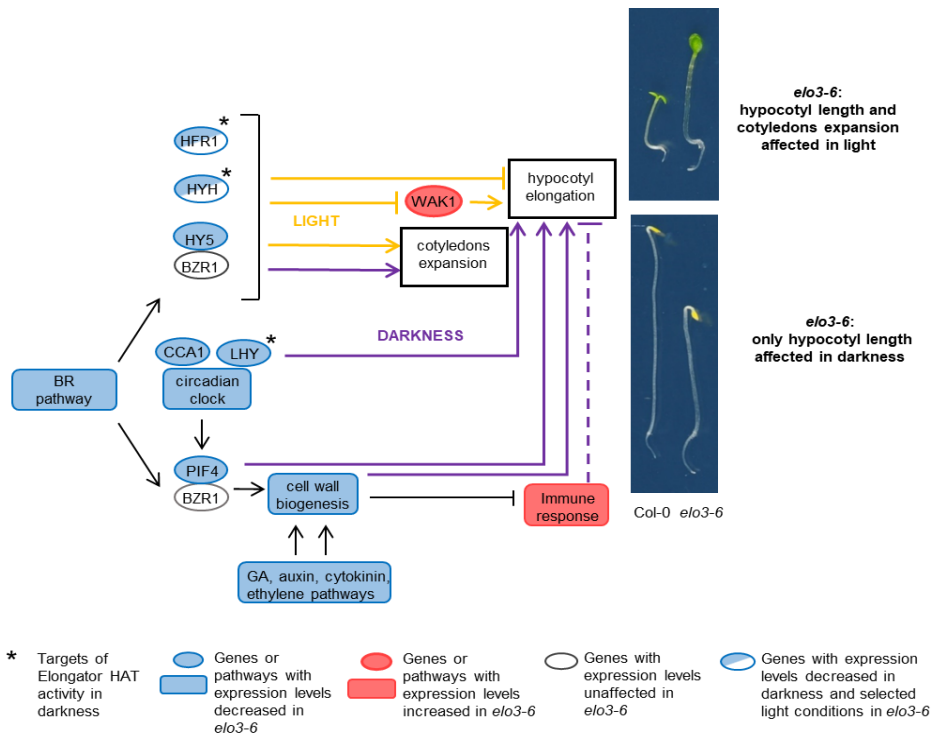
prostowania hipokotyli, były zgodne z wydłużeniem i niepełnym prostowaniem hipokotyli oraz hiponastią liścieni siewek *elo3-6* rosnących w świetle.

Obniżenie ekspresji głównego regulatora fotomorfogenezy *HY5* w świetle czerwonym, dalekiej czerwieni i niebieskim jest najprawdopodobniej główną przyczyną zaburzonej fotomorfogenezy *elo3-6*. Niskiemu poziomowi transkrypcji *HY5* w *elo3-6* towarzyszy bardzo znaczne zwiększenie ekspresji genu kinazy *WAK1* (ang. WALL-ASSOCIATED KINASE 1), która jest negatywnie regulowana przez *HY5* (Zhang i wsp., 2011), odgrywa pozytywną rolę w wydłużaniu komórek (Lally i wsp., 2001) i jest receptorem oligogalakuronidów, które są składnikami szlaku sygnałowego związanego z integralnością ściany komórkowej indukującymi odpowiedź obronną. **Wysoki poziom ekspresji *WAK1* może przyczyniać się do wzmożonego wydłużania hipokotyli** i aktywacji odpowiedzi immunologicznej, co jest zgodne z obniżonym poziomem transkryptów genów związanych z biogenezą wtórnej ściany komórkowej (Miedes i wsp., 2014) u *elo3-6* w świetle czerwonym.

Niestety, nie udało się potwierdzić, że Elongator kontroluje rozwój siewek rosnących w świetle poprzez acetylację histonów. Elongator jest zatem niezbędny dla prawidłowej ekspresji najważniejszych regulatorów fotomorfogenezy i dla funkcjonowania szlaków sygnałowych kontrolowanych przez *HY5*, ale nie poprzez swoją aktywność HAT.

Analiza transkryptomu *elo3-6* i fenotypów mutantów, w których zaburzone są funkcje genów regulowanych przez Elongator, wskazuje, że fenotyp *elo3-6* jest wynikiem obniżonej aktywności wielu genów. Ta obserwacja jest zgodna z topologią sieci genów regulujących wzrost, którą kontroluje Elongator. Sieć ta składa się z wielu czynników transkrypcyjnych pełniących funkcje regulatorów, których działanie zbiega się na biogenezie ściany komórkowej wywierając skumulowane represyjne działanie na wzrost hipokotyli.

Na podstawie uzyskanych wyników **zaproponowano model wyjaśniający rolę Elongatora we wczesnym rozwoju roślin**, który tłumaczy dlaczego w ciemności wolniejszy jest wzrost hipokotyli mutantów *elo*, podczas gdy w świetle zaburzona jest ich fotomorfogeneza i hipokotyle są dłuższe a liścienie mniej otwarte.



Elongator reguluje wydłużanie hipokotyli i otwieranie liści kontrolując ekspresję genów związanych z biogenezą ściany komórkowej i pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy (geny o obniżonej ekspresji – kolor niebieski, geny o wyższej ekspresji – kolor czerwony). W zależności od warunków (ciemność lub światło) jeden ze szlaków sygnałowych (skotomorfogenetyczny lub fotomorfogenetyczny) staje się decydujący i dlatego Elongator może promować przeciwstawne programy regulujące wzrost. W ciemności (linie fioletowe) Elongator acetyluje histony ułatwiając transkrypcję genu regulatora zegara okołodobowego *LHY* oraz pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy *HFR1* i *HYH* (geny z gwiazdką). Składniki zegara okołodobowego *LHY* i *CCA1* pozytywnie wpływają na wydłużanie hipokotyli aktywując czynnik *PIF4* (Nozue i wsp., 2007), stymulujący ekspresję genów uczestniczących w wydłużaniu hipokotyli. Ekspresja *LHY*, *CCA1* i *PIF4* jest obniżona w ciemności w mutancie *elo3-6*, co zaburza ekspresję wielu czynników transkrypcyjnych w hormonalnych szlakach sygnałowych lub biosyntezy ściany komórkowej spowalniając wydłużanie hipokotyli poprzez aktywację odpowiedzi immunologicznej (Hématy i wsp., 2007). Niższy poziom *PIF4* powoduje, że powstaje mniej kompleksów z czynnikiem transkrypcyjnym *BZR1*, co osłabia aktywację transkrypcji genów biogenezą ściany komórkowej (Lozano-Durán i wsp., 2013). Podsumowując, w ciemności fenotyp hipokotyli *elo3-6* jest determinowany przez łączny efekt obniżenia ekspresji genów biosyntezy ściany komórkowej, regulatorów zegara okołodobowego i pozytywnych regulatorów fotomorfogenezy *HY5*, *HYH* i *HFR1* powodując zahamowanie wydłużania i prostowania hipokotyli. To, że końcowy fenotyp charakteryzuje się skróceniem hipokotyli świadczy o tym, że decydujący jest defekt biogenezą ściany

komórkowej. Niska ekspresja *HY5*, *HYH* i *HFR1* w ciemności zapobiega natomiast prostowaniu hipokotyli i otwieraniu się liścieni.

Elongator jest także niezbędny dla prawidłowej odpowiedzi siewek na światło (linie żółte), ponieważ główne pozytywne regulatory fotomorfogenezy *HY5*, *HYH* i *HFR1* mają obniżony poziom transkryptów w mutancie *elo3-6* rosnącym w świetle. Światło powoduje, że wydłużanie hipokotyli jest bardzo wcześnie zahamowane w siewkach typu dzikiego na skutek działania różnych czynników, wśród których znajdują się również *HY5*, *HYH* i *HFR1*. Jednym z elementów tego mechanizmu jest negatywna regulacja ekspresji kinazy *WAK1*, która promuje wydłużanie komórek. W mutancie *elo3-6* obniżona ekspresja *HY5* prowadzi do podwyższonej akumulacji transkryptów *WAK1* i indukcji wydłużania hipokotyli. Z drugiej strony, wyższy poziom ekspresji *WAK1* może uruchamiać odpowiedź immunologiczną, co jest sugerowane przez obniżony poziom transkryptów genów związanych z biogenezą ściany komórkowej i może działać supresyjnie na wydłużanie hipokotyli. Te dwa szlaki sygnałowe wpływają na ostateczną długość hipokotyli, które są dłuższe w siewkach mutantu niż typu dzikiego wskazując, że przeważający jest wpływ szlaku promującego wydłużanie komórek. Obniżona ekspresja *HY5*, *HYH* i *HFR1* w mutancie powoduje mniejsze otwieranie liścieni, co w efekcie przejawia się fenotypem typowym dla defektu fotomorfogenezy. Reasumując, **Elongator działa na styku takich procesów jak wzrost, odpowiedź immunologiczna i fotomorfogeneza i odgrywa rolę w dostrajaniu wzajemnego regulowania się tych procesów na poziomie transkrypcyjnym.**

Opóźnienie wydłużania hipokotyli mające miejsce w ciemności u mutantu *elo3-6* skłoniło nas do analizy **kiełkowania i początkowego wzrostu siewek mutantu** w celu dokładnego określenia stadium, na którym wzrost ulega opóźnieniu. Uzyskane wyniki opisaliśmy w krótkiej publikacji (Wołoszyńska i wsp., 2018b, short communication). Porównaliśmy kiełkowanie i wczesny rozwój siewek mutantu *elo3-6* i typu dzikiego Col-0 stosując eksperyment typu „time-lapse”, w którym zdjęcia roślin robiono co godzinę lub analizując próbki nasion o dużej liczbie pobierane co 3 godziny. Kiełkowanie nasion mutantu było opóźnione o 6 godzin, a wyróżnione stadia wczesnego rozwoju były także osiągnane przez siewki mutantu z 6-cio godzinnym opóźnieniem. Oprócz opóźnienia kiełkowania następowało dodatkowe opóźnienie w wydłużaniu hipokotyli siewek mutantu. Wykazaliśmy, że mniejsza długość hipokotyli *elo3-6* opisana w poprzednim artykule (Wołoszyńska i wsp., 2018a) wynikała z opóźnienia powstającego na bardzo wczesnym etapie wzrostu siewek, które jest niezależne od defektu kiełkowania. Jako że Elongator jest epigenetycznym regulatorem transkrypcji, przeszukaliśmy dane otrzymane po analizie transkryptomu *elo3-6* za pomocą mikromacierzy i odnaleźliśmy kilka związanych z kiełkowaniem genów, takich jak *DOG1* (ang. *DELAY OF GERMINATION 1*) i *DAG2* (ang. *DOF AFFECTING GERMINATION 2*), których ekspresja była niższa w mutancie w porównaniu do typu dzikiego.

W ten sposób pokazaliśmy, że **kiełkowanie jest opóźnione w mutancie *elo3-6*, prawdopodobnie na skutek niższej ekspresji genów kodujących ważne regulatory kiełkowania, i że ten defekt jest niezależny od dodatkowego opóźnienia wydłużania hipokotyli następującego na etapie wczesnego rozwoju siewek.** Ostatecznie zaproponowaliśmy dla Elongatora nową funkcję w kontroli kiełkowania.

4.3.4.2 Monoubikwitynacja histonów H2B przez czynnik elongacji transkrypcji HUB1 ułatwia osiągnięcie maksymalnego poziomu transkrypcji genów zegara okołodobowego

Prowadząc badaniami nad Elongatorem byłam również zaangażowana w projekt, którego celem było udowodnienie, że czynnik elongacji transkrypcji HUB1 biorący udział w monoubikwitynacji histonów H2B, reguluje transkrypcję genów zegara okołodobowego. Wyniki tego projektu zostały opublikowane w czasopiśmie *Plant Journal* (Himanen i wsp., 2012). Geny zegara okołodobowego wyselekcjonowano jako możliwe cele modyfikacji dokonywanych przez HUB1, ponieważ wykazały one obniżoną ekspresję u mutantu *hub1-1*, gdy jego transkryptom porównano z transkryptomami dwóch linii z nadekspresją HUB1 (Himanen i wsp., 2012). Rytm okołodobowy okazał się być jednym z najważniejszych procesów regulacyjnych, którego geny miały obniżony poziom transkryptów w mutancie. Wśród nich znajdowały się *CCA1* i *LHY* – główne składniki centralnej pętli oscylatora okołodobowego. Analiza następujących w ciągu 48 godzin zmian poziomu transkryptów genów *EARLY FLOWERING 4 (ELF4)*, *CCA1*, *LHY*, *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*, *PSEUDO-RESPONSE REGULATOR 5 (APRR5)* i (*LIGHT-HARVESTING CHLOROPHYLL B-BINDING 2*) *LHCB2.1*, wykonana za pomocą PCR w czasie rzeczywistym, potwierdziła, że funkcjonowanie zegara okołodobowego jest zaburzone w mutancie *hub1-1*. **Chociaż normalne okołodobowe zmiany w poziomie transkryptów genów były zachowane w mutancie, to amplitudy tych zmian w przypadku genów *ELF4*, *CCA1* and *LHCB2.1* były mniejsze niż w linii kontrolnej sugerując, że czynnik HUB1 może być niezbędny dla maksymalnego poziomu ekspresji tych genów.** Zgodnie z oczekiwaniami, stwierdzono, że w obszarach kodujących genów zegara okołodobowego *ELF4*, *CCA1*, *TOC1* oraz genów regulowanych przez zegar: *LHCB2.1* i *RIBULOSE BIPHOSPHATE CARBOXYLASE SMALL CHAIN 1A (RbcS)* poziom monoubikwitynacji histonów jest niższy w mutancie niż w linii kontrolnej. Wynik ten wskazywał, że HUB1 jest regulatorem ekspresji wymienionych genów działającym na etapie elongacji transkrypcji. Co więcej, w obszarach kodujących *CCA1*, *LHCB2.1*, *RbcS* i *ELF4* metylacja histonów H3K4 była także niższa w mutancie niż w linii kontrolnej. Obniżone poziomy obu znaków epigenetycznych: H2Bub i H3K4Me3 w mutancie sugerowały, że u roślin, podobnie jak u drożdży (Hwang i wsp., 2003) istnieje związek między tymi modyfikacjami. W przypadku genu *TOC1* poziom modyfikacji H2Bub jest bardzo niski w mutancie *hub1-1*, ale poziom metylacji H3K4Me3 jest wyższy niż w linii kontrolnej, co koreluje

z podwyższoną ekspresją *TOC1*. Zwiększona ekspresja *TOC1* jest zgodna z obniżoną ekspresją *CCA1* i *LHY*, ponieważ te geny regulują nawzajem swoją transkrypcję na zasadzie negatywnego sprzężenia zwrotnego. **Reasumując, analiza ekspresji i modyfikacji histonów genów zegara okołodobowego w mutancie *hub1-1* wskazuje, że HUB1 dokonuje monoubikwitynacji histonów we wszystkich analizowanych genach, ale nie zawsze kontroluje ich ekspresję (np. *TOC1*).** Co więcej, jakkolwiek istnieje związek między monoubikwitynacją H2 a metylacja H3, to obie modyfikacje nie zawsze są skoordynowane. Prawidłowe działanie HUB1 jest krytyczne dla maksymalnej ekspresji wielu genów, ale nie jest konieczne dla inicjacji transkrypcji, dlatego dobowe fluktuacje ekspresji genów są zachowane w mutancie.

HUB1 reguluje elongację transkrypcji, a jego drożdżowy ortolog Bre1 wykazuje genetyczne interakcje z Elongatorem (Xiao i wsp., 2005), dlatego postanowiliśmy sprawdzić genetyczne interakcje między HUB1 a Elongatorem u *Arabidopsis thaliana*. Mutanty *elo3-1* i *elo1-1*, posiadające mutacje w różnych podjednostkach Elongatora, krzyżowano z mutantem *hub1-1*, ale nie otrzymano podwójnych mutantów z powodu ich letalności wynikającej z przerwania rozwoju zarodków w stadium torpedy. Ta silna interakcja genetyczna była zgodna z ko-ekspresją *HUB1* i *ELO3* we wszystkich komórkach i tkankach w embriogenezie na etapie torpedy, co wykryto za pomocą hybrydyzacji *in situ*. Letalny fenotyp podwójnych mutantów był silniejszy niż można by przewidywać na podstawie fenotypów linii rodzicielskich wykazujących jedynie zredukowany wzrost (Nelissen et al., 2005; Fleury et al., 2007; Liu et al., 2007). Tego typu interakcje genetyczne reprezentują wzmocnienie charakterystyczne w przypadku złożonych cech wielogenowych. Fenotypy *hub1* i *elo* są rzeczywiście plejotropowe i charakteryzują się zaburzeniem ekspresji bardzo wielu genów i szlaków sygnałowych. Interakcje między HUB1 a Elongatorem potwierdzono dodatkowo przez analizę porównawczą transkryptomów *hub1-1* i *elo3-1* znajdując wiele wspólnych genów o obniżonej transkrypcji związanych z procesami wzrostu i syntezy chlorofilu, które są bardzo aktywne w zarodkowym stadium torpedy kiedy następuje zatrzymanie rozwoju podwójnego mutantu. **Analizy transkryptomu, modyfikacji histonów i fenotypów mutantów wskazują, że HUB1 modyfikuje histony i reguluje ekspresję bardzo wielu genów, których produkty są aktywne w różnych procesach komórkowych i w ten sposób funkcjonuje jako generalny epigenetyczny regulator ekspresji genów.**

4.3.4.3 Adaptacja i zastosowanie metody Plant-RRBS

Jedną z dobrych tradycji VIB była zawsze bliska współpraca z przemysłem. Zespół prof. Mieke Van Lijsebettens również zrealizował kilka projektów naukowych we współpracy z koncernem Bayer CropScience, którego filia jest zlokalizowana po sąsiedzku w Parku Technologicznym w Gandawie. Naukowcy z Bayer CropScience uzyskali niemodyfikowane genetycznie rośliny

rzepaku i ryżu o ulepszonych parametrach wzrostu i wydajności produkcji nasion, które wyprowadzono z linii kontrolnej po kilku rundach kojarzenia wsobnego połączonego z selekcją osobników o niskim poziomie oddychania mitochondrialnego i wysokiej wydajności wykorzystania energii (Hauben i wsp., 2009; Meng i wsp., 2016; Verkest i wsp., 2015). Uzyskane linie nazwano epiliniami, ponieważ były izogeniczne wobec wyjściowej linii kontrolnej i posiadały odróżniające je sygnatury epigenetyczne dotyczące metylacji cytozyn, metylacji histonów H3 i acetylacji histonów H4. W 2013 roku zostałam zaproszona do wzięcia udziału w projekcie, którego celem było zaprojektowanie wysokoprzepustowej, relatywnie taniej i powtarzalnej metody profilowania metylacji DNA, która mogłaby być wykorzystana do detekcji metylacji cytozyn i identyfikacji osobników posiadających interesujące epiallele, które są uzyskiwane podczas selekcji epilini. Aby zrealizować ten cel zdecydowaliśmy się na optymalizację metody sekwencjonowania DNA o zredukowanej reprezentacji po reakcji z wodorosiarczynem (ang. RRBS), która w tamtym czasie była wykorzystywana jedynie w badaniach nad metylacją genomów zwierząt. Udało się nam wprowadzić tę metodę do badań epigenetycznych roślin i nazwaliśmy ją plant-RRBS (Schmidt i wsp., 2017). Protokół metody RRBS zaczyna się od trawienia DNA genomowego enzymem restrykcyjnym i selekcji uzyskanych fragmentów pod względem wielkości, która jest zoptymalizowana tak, aby uzyskać regiony bogate w cytozyny o dużym znaczeniu dla epigenetycznej regulacji ekspresji genów. Po tym etapie następuje konwersja cytozyn w reakcji z wodorosiarczynem, sekwencjonowanie nowej generacji (NGS) i analiza bioinformatyczna oceniająca poziom metylacji cytozyn, który jest następnie porównywany między analizowanymi osobnikami umożliwiając detekcję odmiennie metylowanych cytozyn.

Protokół metody plant-RRBS opracowano wykorzystując jako model linię kontrolną ryżu oraz wyprowadzoną z niej epilinę LR2, z których analizowano po pięć niezależnych roślin jako powtórzeń biologiczne. Pierwszym krokiem była optymalizacja metody izolacji DNA genomowego w celu otrzymania preparatów o wysokiej jakości, czystości i nie zdegradowanych. Wybraliśmy dwa zestawy enzymów restrykcyjnych: *MspI* (C-CGG) w połączeniu z *DpnII* (-GATC) lub *ApeKI* (G-CWGG), rozpoznające i przecinające sekwencje zawierające cytozynę, co pozwoliło na wzbogacenie puli otrzymanych fragmentów w te pochodzące z obszarów bogatych w nukleotydy G/C we wszystkich kontekstach sekwencji (CG, CHG and CHH). Ten wybór restryktaz został potwierdzony przez wyniki przeprowadzonego *in-silico* trawienia restrykcyjnego genomu referencyjnego ryżu *Oryza sativa ssp. Indica*, które wykazało, że uzyskane fragmenty restrykcyjne o wielkości 150 – 420 pz odpowiadającej wielkości insertów biblioteki NGS, będą reprezentowały znaczną część genomu (37% dla *MspI-DpnII* i 25% dla *MspI-ApeKI*). Analiza *in-silico* przewiduje, że podobnie reprezentatywne byłyby wyniki zastosowania obu kombinacji enzymów dla innych gatunków roślin wskazując, że metoda plant-RRBS może być szeroko stosowana. Fragmentów DNA

uzyskanych na drodze podwójnego trawienia restrykcyjnego użyto do skonstruowania biblioteki po konwersji w reakcji z wodosiarczynem i oczyszczaniu połączonym z selekcją fragmentów o odpowiedniej wielkości za pomocą odwracalnej immobilizacji do kulek magnetycznych. Uzyskane biblioteki były sekwencjonowane technologią Illumina HiSeq 2500, a uzyskane odczyty sekwencji poddano specjalnie zaprojektowanej analizie bioinformatycznej, którą opracowano na bazie konwencjonalnych i łatwo dostępnych programów.

Na ostatnim etapie odczyty sekwencji były mapowane do genomu referencyjnego, a następnie wykrywano metylacje cytozyny i ustalano poziom metylacji w pozycjach, dla których z przynajmniej dziesięciu odczytów uzyskano informację o ich statusie (C lub T, niemetylowane cytozyny ulegają konwersji do tyminy pod wpływem wodorosiarczynu w trakcie konstruowania biblioteki). Główne pytania dotyczące potencjalnego zastosowania metody plant-RRBS brzmiały: Jak dużą część genomu i jak wiele cytozyn można analizować za pomocą tej metody? Które regiony genomu podlegają analizie (geny, promotory, regiony międzygenowe, etc.)? Jak dokładnie, za pomocą przewidywania *in silico*, można wyznaczyć regiony, które w rzeczywistości będą analizowane? Nasz pilotażowy eksperyment wykorzystujący metodę plant-RRBS zawierał pięć powtórzeń biologicznych każdej z dwóch porównywanych linii ryżu. Dlatego kolejne pytania dotyczyły powtarzalności proponowanej przez nas metody: w jakim stopniu części genomu, o których uzyskujemy informację dla poszczególnych powtórzeń biologicznych pokrywają się ze sobą i jaka jest proporcja cytozyn, które analizujemy we wszystkich powtórzeniach?

Okazało się, że **średnio aż 31% genomu zostało objęte przez każdą z pięciu bibliotek** (każde powtórzenie biologiczne) i wskaźnik ten był wyższy dla kombinacji *MspI-DpnII* niż dla *MspI-ApeKI* zgodnie z przewidywaniami *in silico*. **Ze wszystkich cytozyn w genomie, mogliśmy ocenić status metylacji dla 24.5 do 34.1% dla trawienia enzymami *MspI-ApeKI* i dla 22.9 do 48.7% dla *MspI-DpnII*.** Około połowy wykrytych cytozyn było zlokalizowanych w regionach nie mających adnotacji, ale bardzo **duża ich część, bo około 35%, znajdowała się w promotorach.** Metylacje w kontekście CG wykrywano często w intronach lub w pozycjach pozbawionych adnotacji w przeciwieństwie do promotorów, gdzie metylacje CG występowały z niską częstością. W zależności od osobnika oraz kombinacji enzymów restrykcyjnych, spośród wszystkich fragmentów przewidzianych *in silico* około 55 do 78% można było odnaleźć wśród zmapowanych odczytów, co wskazuje na to, że metoda plant-RRBS pozwala na sprawne i wydajne generowanie informacji o metylacji cytozyn. Proporcja tych cytozyn, które zanalizowano we wszystkich pięciu powtórzeniach biologicznych danej linii dla danego trawienia enzymatycznego wahała się między 15 a 25% wszystkich cytozyn znajdujących się w genomie.

Ostatecznie wyciągnęliśmy wniosek, że metoda plant-RRBS pozwala na analizę metylacji maksymalnie $\frac{1}{4}$ cytozyn znajdujących się w genomie ryżu przy zastosowaniu enzymów

restrykcyjnych *MspI-DpnII* i pięciu powtórzeń biologicznych. Kiedy liczbę cytozyn zanalizowanych we wszystkich pięciu powtórzeniach biologicznych mierzono za pomocą wskaźnika Jaccard'a, a więc w odniesieniu do wszystkich cytozyn, które znalazły się w bibliotece przynajmniej jednego powtórzenia biologicznego dla danej linii ryżu i kombinacji enzymów restrykcyjnych (zamiast w odniesieniu do wszystkich cytozyn w genomie), uzyskane proporcje były bardziej jednorodne i wahały się między 33.6 i 46.1%.

Porównanie metody plant-RRBS do sekwencjonowania całego genomu po reakcji z wodorosiarczynem (WGBS ang. Whole Genome Bisulfite Sequencing) wykonane dla linii kontrolnej i dla epilinii LR2 wykazało, że metoda WGBS pozwoliła oczywiście na uzyskanie informacji o znacznie większej części genomu, ale proporcja między liczbą zanalizowanych cytozyn a wielkością zanalizowanej części genomu była niemal dwukrotnie wyższa w przypadku plant-RRBS. Wynika stąd, że **plant-RRBS pozwala na bardziej wydajną analizę metylacji cytozyn, ponieważ wymaga mniejszej liczby odczytów sekwencji w porównaniu z WGBS.**

Wreszcie oceniono potencjał metody plant-RRBS w porównawczej analizie metylacji cytozyn stwierdzając, że pozwoliła ona na wykrycie ponad tysiąca cytozyn metylowanych odmiennie w linii kontrolnej i epilinii LR2. Wykryte odmiennie metylowane cytozyny znajdowały się głównie w obszarach nie posiadających adnotacji genomowych, w tym w promotorach.

Reasumując, proponowana metoda plant-RRBS pozwala na porównawcze profilowanie metylacji cytozyn w wielu próbkach zapewniając wysoce powtarzalną i dokładną detekcję odmiennie metylowanych pozycji DNA. W porównaniu do WGBS, metoda plant RRBS, oferuje wykrywanie metylacji cytozyn przy bardziej efektywnym wykorzystaniu danych uzyskanych po sekwencjonowaniu DNA.

4.3.5 PODSUMOWANIE

Najważniejsze wyniki badań, które przyczyniły się do osiągnięcia naukowego będącego podstawą do ubiegania się o stopień doktora habilitowanego:

1. Udowodnienie, że Elongator reguluje kiełkowanie, skotomorfogenezę oraz fotomorfogenezę *Arabidopsis thaliana* i szczegółowe wyjaśnienie jego roli, w tym epigenetycznej regulacji ekspresji genów, w procesie skotomorfogenezy
2. Wykazanie, że monoubikwitynacja histonów przez kompleks HUB1/HUB2 jest niezbędna dla maksymalnej ekspresji genów zegara okołodobowego, co przemawia za rolą kompleksu w regulacji elongacji transkrypcji.
3. Zaadaptowanie i zoptymalizowanie dla organizmów roślinnych metody profilowania metylacji cytozyn - plant-RRBS i zweryfikowanie przydatności tej metody na przykładzie linii kontrolnej i wprowadzonej z niej epilinii ryżu.

5. Omówienie pozostałych osiągnięć naukowo-badawczych

5.1 Osiągnięcia w pracy badawczej przed uzyskaniem stopnia doktora

5.1.1 Publikacje

Prace oryginalne

1. Jańska H, Sarria R, **Wołoszyńska M**, Arrieta-Montiel M, Mackenzie S. 1998. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. **The Plant Cell**, 10: 1163-1180. **IF 11,757**, punktacja MNiSW 21
2. Jańska H, **Wołoszyńska M**. 1996. Molekularne podstawy cytoplazmatycznej męskiej sterylności u roślin wyższych. **Postępy Biochemii** 42(3), 253- 259,
3. Janska H, **Woloszynska M** 1997. The dynamic nature of plant mitochondrial genome. **Acta Biochimica Polonica** 44(2), 239-250. **IF 0,522**

5.1.2 Omówienie celu naukowego prac i osiągniętych wyników

Zainteresowanie genetyką oraz budową i metabolizmem kwasów nukleinowych sprawiło, że w październiku 1988 roku podjęłam studia na kierunku biotechnologia Wydziału Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego. Na czwartym roku studiów, w ramach programu stypendialnego TEMPUS, odbyłam staż zagraniczny na Uniwersytecie w Aarhus w Danii. Pracując pod kierunkiem dr. Erika Østergaarda Jensena (Laboratory of Gene Expression, Department of Molecular Biology) wykonałam część eksperymentalną pracy magisterskiej pt.: "Molecular analysis of histone and histone-like proteins from soybean root nodules". Pracę napisałam pod kierunkiem prof. Hanny Jańskiej w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego, gdzie w czerwcu 1994 roku uzyskałam tytuł magistra biotechnologii.

Od 1994 do 1999 roku prowadziłam badania naukowe dotyczące struktury, organizacji i ewolucji genomu mitochondrialnego roślin, których wyniki zawarłam w pracy doktorskiej pt.: „Heteroplazmia u fasoli zwykłej – geneza i zmienność” napisanej w Instytucie Biochemii i Biologii Molekularnej Uniwersytetu Wrocławskiego pod kierunkiem prof. Hanny Jańskiej. Heteroplazmia to współistnienie różnych typów mtDNA (mitotypów) w komórce. Mitotyp dominujący ilościowo to genom główny, którego informacja genetyczna determinuje fenotyp rośliny. Liczba cząsteczek dodatkowego typu mtDNA jest znacznie niższa i dlatego są one nazywane cząsteczkami substechiometrycznymi lub sublimonami. Sublimony powstają najczęściej w wyniku rekombinacji homologicznych między krótkimi jednostkami powtórzonymi. Najważniejszym osiągnięciem tej pracy, zawartym w publikacji „Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility”, było odkrycie przesunięcia substechiometrycznego prowadzącego do powstania nowego genomu mitochondrialnego wyłącznie w wyniku zmian ilościowych mtDNA:

amplifikacji sublimonów i jednoczesnej redukcji liczby kopii genomu głównego. Przesunięcie substechiometryczne jest połączone z aktywacją lub wyciszeniem genów.

5.2 Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

5.2.1 Publikacje

Prace oryginalne

4. Arrieta-Montiel M, Lyznik A, **Wołoszynska M**, Janska H, Tohme J, Mackenzie S 2001. Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. **Genetics** 158, 851-64, punktacja MNiSW 21 **IF 4,83**, punktacja MNiSW 21
5. **Wołoszyńska M**, Kieleczawa J, Ornatowska M, Woźniak M, Jańska H. 2001. The origin and maintenance of the small repeat in the bean mitochondrial genome. **Molecular Genetics and Genomics** 265, 865-872. **IF 2,472**, punktacja MNiSW 16
6. **Wołoszynska M**, Kanczewska J, Drabkin A, Dambly S, Maudoux O, Boutry M 2003. Function and regulation of the two major plasma membrane H⁺-ATPases. **Ann New York Acad Sci**, 986: 1-6, **IF 1,892**, punktacja MNiSW 21
7. **Wołoszyńska M**, Bocer T, Mackiewicz P, Jańska H. 2004. A fragment of chloroplast DNA was transferred horizontally, probably from non-eudicots, to mitochondrial genome of *Phaseolus*. **Plant Molecular Biology** 56: 811-820. **IF 3,51**, punktacja MNiSW 21
8. **Wołoszyńska M**, Kmiec B, Mackiewicz P, Jańska H. 2006. Copy number of bean mitochondrial genes estimated by real-time PCR does not correlate with the number of gene loci and transcript levels. **Plant Molecular Biology**, 61: 1 – 12. **IF 3,577**, punktacja MNiSW 24
9. **Wołoszyńska M**, Trojanowski D. 2009. Counting mtDNA molecules in *Phaseolus vulgaris*: sublimons are constantly produced by recombination via short repeats and undergo rigorous selection during substoichiometric shifting. **Plant Molecular Biology** 70: 511-521. **IF 3,978**, punktacja MNiSW 24
10. Majewski P, **Wołoszynska M**, Janska H. 2009. Developmentally early and late onset of Rps10 silencing in *Arabidopsis thaliana*: genetic and environmental regulation. **Journal of Experimental Botany** 60:1163-78, **IF 4,271**, punktacja MNiSW 24
11. **Wołoszyńska M**, Gola EM, Piechota J. 2012. Changes in accumulation of heteroplasmic mitochondrial DNA and frequency of recombination via short repeats during plant lifetime in *Phaseolus vulgaris*. **Acta Biochimica Polonica** 59: 703 – 709. **IF 1,185**, punktacja MNiSW 15
12. Chiappetta A, Muto A, Bruno L, **Wołoszynska M**, Van Lijsebettens M, Bitonti MB. 2015 A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in Arabidopsis transgenic plants. **Front Plant Sci**. 30;6:392, **IF 3.948**, punktacja MNiSW 40

Prace przeglądowe

13. **Wołoszynska M**, Oziemlak A, Janska H. 2001. Heteroplasmy in plants. *Biotechnologia* 1, 42-47.

14. Paprocka M, **Wołoszyńska M.** 2004. Posttranscriptional gene silencing in plants. *Kosmos*, 2: 193-200.
15. Kmiec B, Drynda R, **Wołoszyńska M.** 2005. Molecular basis of plants response to low temperature. *Biotechnologia* 3: 184 – 200.
16. Kmiec B, **Wołoszyńska M**, Janska H. 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. **Current Genetics**, 50: 149-59, **IF 2,22**, punktacja MNiSW 20
17. **Wołoszyńska M.** 2010 Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes – though this be madness, yet there's method in't. **Journal of Experimental Botany**, 61: 657-71, **IF 4,816**, punktacja MNiSW 45
18. Van Lijsebettens M, Dürr J, **Wołoszyńska M**, Grasser KD. 2014 Elongator and SPT4/SPT5 complexes as proxy to study RNA polymerase II transcript elongation control of plant development. **Proteomics**. 14(19):2109-2114, **IF 3,807**, punktacja MNiSW 35

5.2.2 Osiągnięcia w pracy badawczej po uzyskaniu stopnia doktora

Po obronie pracy doktorskiej prowadziłam badania naukowe dotyczące czterech zagadnień:

1. Bezpośrednio po doktoracie do września 2000 roku i po powrocie z pierwszego stażu zagranicznego kontynuowałam badania nad **roślinnym genomem mitochondrialnym i heteroplazmią** (2002 – 2009).
2. Podczas stażu w Physiological Biochemistry Unit, Catholic University of Louvain w Louvain-la-Neuve w Belgii w latach 2000 – 2002, zajmowałam się badaniem **regulacji roślinnych H⁺-ATPaz zlokalizowanych w błonie plazmatycznej *Nicotiana plumbaginifolia***.
3. W latach 2004 – 2007 brałam udział w realizacji projektu badawczego "**Wykorzystanie RNAi w genomice funkcjonalnej i biotechnologii roślin uprawnych**".
4. Od października 2010 do końca 2015 roku, podczas stażu zagranicznego we Flamandzkim Instytucie Biotechnologii VIB w Gandawie w Belgii, prowadziłam badania nad **epigenetycznymi mechanizmami regulacji wzrostu roślin**. Większość uzyskanych tam wyników wchodzi w skład osiągnięcia naukowego będącego podstawą do ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego. W tym podrozdziale zostaną opisane pozostałe wyniki.

5.2.2.1 Heteroplazmia, rekombinacja i ewolucja genomu mitochondrialnego *Phaseolus vulgaris*.

Kontynuując badania nad genomem mitochondrialnym fasoli zwykłej skupiłam się na wyjaśnieniu mechanizmu powstawania krótkich jednostek powtórzonych mtDNA i na ich aktywności rekombinacyjnej biorącej udział w tworzeniu sublimonów i utrzymaniu heteroplazmatycznej populacji cząsteczek mtDNA. Badałam również związek między liczbą kopii genów mitochondrialnych a poziomem ich transkryptów oraz opisałam transfer horyzontalny sekwencji DNA do mitochondriów.

Ustaliliśmy, że powodująca męską sterylność fasoli sekwencja *pvs* ewoluowała na poziomie substechiometrycznym i powstała w wyniku rekombinacji, a następnie uległa amplifikacji i ekspresji. Ta część wyników została opisana w publikacji „Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean” (Arrieta-Montiel i wsp., 2001).

Do najważniejszych osiągnięć uzyskanych w tym okresie zaliczam identyfikację krótkiej jednostki powtórzonej (314 pz) w kilku gatunkach fasoli oraz odkrycie prekursorowych sekwencji DNA, które umożliwiło zaproponowanie mechanizmu powstawania tego typu jednostek powtórzonych w następstwie serii rekombinacji umiejscowionych i homologicznych. Wyniki te zostały opisane w 2001 roku w publikacji „The origin and maintenance of the small repeat in the bean mitochondrial genome” (Woloszynska i wsp., 2001). Kontynuując ten nurt badań zastosowałam technikę ilościowego PCR w czasie rzeczywistym i udowodniłam, że zidentyfikowana jednostka powtórzona wykazuje regularną aktywność rekombinacyjną, w wyniku której w mitochondriach fasoli powstają i są utrzymywane sublimony. To twierdzenie przeczyło ówczesnemu przekonaniu, że krótkie jednostki powtórzone rekombinują jedynie sporadycznie przyczyniając się wprawdzie do powstawania sublimonów, ale utrzymywanie tych ostatnich w mitochondriach zależy od innego mechanizmu. Efektem tej części badań był artykuł: „Counting mtDNA molecules in *Phaseolus vulgaris*: sublimons are constantly produced by recombination via short repeats and undergo rigorous selection during substoichiometric shifting”, który ukazał się w 2009 roku (Woloszynska i Trojanowski, 2009). W ostatniej publikacji poświęconej heteroplazmii („Changes in accumulation of heteroplasmic mitochondrial DNA and frequency of recombination via short repeats during plant lifetime in *Phaseolus vulgaris*”) wykazaliśmy, że w starszych liściach maleje ogólna liczba kopii mtDNA, ale liczba kopii sublimonów rośnie, co wskazuje na większą częstość rekombinacji w obrębie powtórzenia 314 pz. Ponadto w młodych liściach rekombinacja jest symetryczna, natomiast w liściach wykazujących senescencję równowaga rekombinacyjna przesuwa się w stronę zdarzeń asymetrycznych powodując nadreprezentację jednego z produktów (Woloszynska i wsp., 2012).

Częste w mtDNA roślin insercje, delecje, duplikacje lub inwersje mogą obejmować sekwencje kodujące białka oraz cząsteczki rRNA lub tRNA. Ten sam gen może posiadać różną liczbę loci u blisko spokrewnionych gatunków roślin, a nawet w obrębie tego samego gatunku. Konsekwencją takich różnic może być zmiana w poziomie transkrypcji genu. Jednak ze względu na bardzo skomplikowaną organizację roślinnych genomów mitochondrialnych zawierających wiele cząsteczek DNA o różnej długości i liczbie kopii, bezpośredni związek między liczbą loci danego genu a poziomem jego transkryptów nie jest oczywisty. W publikacji „Copy number of bean mitochondrial genes estimated by real-time PCR does not correlate with the number of gene loci and transcript levels” opisałam badania wskazujące, że rzeczywista (wyznaczona eksperymentalnie) liczba kopii genów mitochondrialnych nie jest zgodna z liczbą ich loci i że nie ma korelacji między liczbą kopii genów mitochondrialnych a poziomem ich transkryptów. Innymi słowy, transkrypcja roślinnych genów mitochondrialnych nie jest regulowana przez liczbę ich kopii (Wołoszynska i wsp., 2006).

Obecnie horyzontalny transfer genów (HTG) do mitochondriów zdarzający się między odległymi gatunkami roślin wyższych jest dobrze znanym zjawiskiem i nie budzi już takich kontrowersji jak w 2004 roku, kiedy ukazała się publikacja, której jestem pierwszą autorką pt: "A fragment of chloroplast DNA was transferred horizontally, probably from non-eudicots, to mitochondrial genome of *Phaseolus*" (Wołoszynska i wsp., 2004). Wówczas dostępne były tylko trzy doniesienia na ten temat, a ta praca była pierwszą dowodzącą transferu horyzontalnego sekwencji DNA z chloroplastów do mitochondriów. Przedmiotem badań był fragment intronu chloroplastowego genu *trnA*, nazwany *pvs-trnA*, ponieważ jest częścią sekwencji *pvs* determinującej męską sterylność. Sekwencja *pvs-trnA* została zidentyfikowana tylko w trzech gatunkach rodzaju *Phaseolus* i okazało się, że chociaż zawiera zaledwie 190 pz, różni się od chloroplastowej sekwencji *trnA* fasoli aż w 10 pozycjach i jest najbardziej podobna do chloroplastowych genów *Philodendron scandens* i *Magnolia grandiflora* wykazując tylko 3 różnice. Otrzymane drzewa filogenetyczne umieściły *pvs-trnA* pomiędzy roślinami z rzędów jednoliściennych i magnoliowców, na pozycji izolowanej od roślin motylkowych, do których należy fasola. Te oraz inne wyniki badań opisanych w omawianej publikacji, pozwoliły wnioskować, że sekwencja *pvs-trnA* nie powstała w wyniku wewnątrzkomórkowego transferu z chloroplastów do mitochondriów tej samej rośliny, ale na skutek horyzontalnego transferu fragmentu intronu *trnA* z chloroplastów rośliny niedwuliściennej do mitochondriów rośliny z rodzaju *Phaseolus*.

5.2.2.2 Regulacja roślinnych H⁺-ATPaz zlokalizowanych w błonie plazmatycznej *Nicotiana plumbaginifolia* za pomocą fosforylacji treoniny i wiązania białek 14-3-3.

W październiku 2000 roku rozpoczęłam dwuletni staż w laboratorium prof. Marca Boutry'ego na Uniwersytecie w Louvain-la-Neuve w Belgii. Zajmowałam się badaniem regulacji roślinnych H⁺-ATPaz zlokalizowanych w błonie plazmatycznej *Nicotiana plumbaginifolia*. Enzymy te biorą udział w tworzeniu potencjału transmembranowego i gradientu pH aktywujących drugorzędowe transportery błonowe. Podstawowym problemem w badaniu H⁺-ATPaz była jednoczesna ekspresja kilku izoform w komórkach tego samego typu. Dlatego wybrano dwie izoformy PMA2 i PMA4, obecne w wielu tkankach *N. plumbaginifolia* i poddano je ekspresji w komórkach *Nicotiana tabacum* BY-2 stosując do transformacji plazmid zawierający geny *pma2* lub *pma4* z dołączoną na N-końcu etykietką sześciu histydyn. Brałam udział w opracowaniu metody oczyszczania PMA2 i PMA4 za pomocą chromatografii powinowactwa na kolumnach niklowych. Ten roślinny system ekspresji indywidualnych izoform H⁺-ATPazy został opisany w publikacji pt.: „Function and regulation of the two major plasma membrane H⁺-ATPases” (Wołoszyńska i wsp., 2003). Opracowanie tego modelu eksperymentalnego umożliwiło dalsze badania nad regulacją H⁺-ATPazy przez fosforylację przedostatniej reszty aminokwasowej (treoniny) oraz wiązanie regulatorowych białek 14-3-3 w odpowiedzi na stres środowiskowy.

5.2.2.3 Regulacja wyciszania genu *Rps10* u *Arabidopsis thaliana*.

W latach 2004 – 2007 prof. Hanna Jańska, w której zespole pracowałam, kierowała realizacją grantu dotyczącego wykorzystania techniki RNAi. Uczestniczyłam w projektowaniu i analizie eksperymentów dotyczących wyciszania genu *Rps10*, których wyniki zawarłam w publikacji pt.: „Developmentally early and late onset of *Rps10* silencing in *Arabidopsis thaliana*: genetic and environmental regulation” (Majewski i wsp., 2009). Celem naukowym projektu było wyjaśnienie przyczyn różnorodności fenotypów obserwowanej wśród roślin, w których wyciszono gen *Rps10*. Zjawisko takiej różnorodności jest często spotykanym i intrygującym problemem związanym z wyciszaniem genów. Udowodniliśmy, że różnorodność fenotypowa roślin towarzysząca wyciszeniu genu jest związana z momentem rozpoczęcia wyciszania i z jego wydajnością, które z kolei zależą od zygotyczności transgeny, zdolności loci transgeny do inicjowania wyciszenia oraz od fotoperiodu. Najważniejszym i najnowszym w momencie publikacji odkryciem tej pracy było wykazanie, że fotoperiod może regulować inicjację wyciszania genów.

5.2.2.4 Epigenetyczna kontrola ekspresji genów w regulacji wzrostu i rozwoju roślin.

W latach 2010 - 2015 pracowałam w zespole prof. Mieke Van Lijsebettens (VIB, Gandawa, Belgia) gdzie brałam udział w realizacji pięciu projektów dotyczących epigenetycznej kontroli

ekspresji genów u roślin. Wyniki realizacji trzech z nich należą do osiągnięcia będącego podstawą ubiegania się o tytuł doktora habilitowanego, tutaj opiszę rezultatu dwóch pozostałych projektów.

HUB1 i monoubikwitynacja histonów

W latach 2014 i 2015 kontynuowałam badania nad ligazą HUB1 i monoubikwitynacją histonów analizując białka KHD oraz SPEN oddziałujące z kompleksem HUB1/HUB2. KHD i SPEN posiadają odpowiednio domenę K-homologiczną i motyw rozpoznawania RNA, które są typowe dla białek wiążących RNA i posiadających aktywność obróbki pre-mRNA. Szczegółowa analiza filogenetyczna obu białek, badania nad ich lokalizacją i ko-ekspresją oraz porównanie fenotypów, transkryptomów i monoubikwitynacji histonów w odpowiednich mutantach, sugerują wspólne i specyficzne funkcje HUB1, KHD i SPEN. Oddziaływanie HUB1 z białkiem SPEN wskazuje na związek między monoubikwitynacją histonów podczas elongacji transkrypcji a splicingiem pre-mRNA. Wyniki te zawarte są w publikacji „Histone 2B monoubiquitination complex links transcript elongation to splicing of pre-mRNA and noncoding RNA in the regulation of circadian clock and flowering time.” Publikacja została wysłana do czasopisma PNAS, uzyskała recenzje i jest obecnie poprawiana zgodnie ze wskazówkami recenzentów.

Analiza morfologii i ekspresji genów potrójnego mutantu *drm1 drm2 cmt3*

Moja pasja do pracy eksperymentalnej często wpływała na przebieg kariery naukowej, ponieważ byłam zainteresowana nowymi technikami i szukałam możliwości nauki, zastosowania i optymalizacji metod, tak jak w przypadku qPCR w czasie rzeczywistym, ChIP-qPCR i plant-RRBS. Immunoprecypitacja metylowanego DNA (MeDIP, ang. Methylated DNA Immunoprecipitation) była kolejną poznaną przeze mnie metodą. W latach 2014 i 2015 współpracowałam z Ivano Forgione, doktorantem z Uniwersytetu w Kalabrii, którego promotorem pomocniczym była Mieke Van Lijsebettens. Wspólnie zoptymalizowaliśmy MeDIP i wykorzystaliśmy tę metodę do analizy regulacji genów związanych z działaniem hormonu auksyny w potrójnym mutancie *drm1 drm2 cmt3 (ddc) Arabidopsis thaliana* wykazującym defekt zarówno utrzymania, jak i *de novo* metylacji DNA. Potrójny mutant *drm1 drm2 cmt3* posiada zaburzony grawitropizm korzeni i zmienioną morfologię liści, które są pofałdowane. Analiza ekspresji genów wykazała zmieniony poziom ekspresji genów związanych z biosyntezą, przekazywaniem sygnałów i transportem auksyn oraz genów odgrywających ważną rolę w rozwoju liści. Wysoki w mutancie *drm1 drm2 cmt3* poziom ekspresji genu *YUCCA2* kodującego jeden z enzymów biosyntezy auksyn, udało nam się skorelować z niższą metylacją DNA tego genu, którą badaliśmy stosując technikę MeDIP. Stwierdziliśmy również zwiększoną ekspresję genu *CLF (CURLY LEAF)*, którego produkt białkowy bierze udział w represji genów poprzez metylację lizyny 27 histonów H3. Ekspresja kilku genów regulowanych

przez *CLF* była natomiast obniżona sugerując zwiększoną metylację ich histonów. Rzeczywiście, stosując metodę ChIP-qPCR wykryliśmy zwiększoną metylację histonów w promotorze genu *KNAT6*, która może wyjaśniać jego niższą ekspresję. Nasze wyniki dowodzą interakcji między metylacją DNA a metylacją histonów i wskazują na istnienie powiązań między różnymi rodzajami modyfikacji epigenetycznych. Uzyskane rezultaty zostały zawarte w manuskrypcie Forgione i wsp. Pod tytułem: "Regulation of auxin biosynthesis and distribution by DNA methyltransferases in *Arabidopsis*", który został wysłany do czasopisma *Frontiers in Plant Science*.

6. Plany kontynuacji pracy naukowej

W najbliższych latach zamierzam kontynuować badania nad rolą kompleksu Elongatora w fotomorfogenezie. W grudniu minionego roku przedstawiłam do oceny przez Narodowe Centrum Nauki projekt pt.: "Regulacja fotomorfogenezy *Arabidopsis thaliana* przez Elongator – białkowy kompleks epigenetycznie regulujący ekspresję genów." Projekt ten został pozytywnie oceniony i zatwierdzony do finansowania, jego realizację rozpoczynam w październiku tego roku. Projekt przewiduje porównawczą analizę transkryptomów rosnących w świetle roślin mutantu *elo* i typu dzikiego w celu identyfikacji genów o różnej ekspresji. Równocześnie, za pomocą metody ChIP-Seq, będą wykrywane geny, z którymi wiąże się Elongator. W tym celu wykorzystamy rośliny transgeniczne z nadekspresją genu fuzyjnego *GFP-ELO3* oraz rośliny kontrolne z nadekspresją genu *GFP*. Geny wykazujące odmienną ekspresję w mutancie *elo*, a jednocześnie będące miejscami wiązania Elongatora, będą identyfikowane jako regulowane przez Elongator podczas fotomorfogenezy. Wybrane geny będą następnie analizowane za pomocą ChIP-qPCR i MeDIP aby wykryć różnice odpowiednio w acetylacji histonów i/lub metylacji DNA i ustalić aktywności Elongatora biorące udział w regulacji poszczególnych genów. Aby potwierdzić znaczenie wybranych genów regulowanych przez Elongator podczas fotomorfogenezy, linie transgeniczne z nadekspresją tych genów będą krzyżowane z mutantem *elo*, a fenotypy uzyskanych podwójnych mutantów będą analizowane na etapie wczesnej fotomorfogenezy.

7. Literatura

- Aiese-Cigliano**, R., Cremona, G., Paparo, R., Termolino, P., Perrella, G., Gutzat, R., Consiglio, M.F., Conicella, C., 2013. Histone deacetylase AtHDA7 is required for female gametophyte and embryo development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 163, 431e440.
- Arrieta-Montiel** M, Lyznik A, Wołoszyńska M, Janska H, Tohme J, Mackenzie S 2001. Tracing evolutionary and developmental implications of mitochondrial stoichiometric shifting in the common bean. *Genetics* 158, 851-64
- Barra**, L., Aiese-Cigliano, R., Cremona, G., De Luca, P., Zoppoli, P., Bressan, R.A., Consiglio, M.F., Conicella, C., 2012. Transcription profiling of laser microdissected microsporocytes in an *Arabidopsis* mutant (*atmcc1*) with enhanced histone acetylation. *J. Plant Biol.* 55, 281e289.
- Becker**, C., J. Hagmann, J. Muller, D. Koenig, O. Stegle, K. Borgwardt, and D. Weigel. 2011. Spontaneous epigenetic variation in the *Arabidopsis thaliana* methylome. *Nature* 480:245
- Berger**, S.L. (2007) The complex language of chromatin regulation during transcription. *Nature* 447, 407–412
- Bourbousse** C, et al. (2012) Histone H2B monoubiquitination facilitates the rapid modulation of gene expression during *Arabidopsis* photomorphogenesis. *PLoS Genet* 8(7), e1002825.
- Bewick** AJ, Ji LX, Niederhuth CE, Willing EM, Hofmeister BT, Shi XL *et al.*, 2016 On the origin and evolutionary consequences of gene body DNA methylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 113:9111–9116.
- Cao**, Y., Dai, Y., Cui, S., and Ma, L. (2008). Histone H2B monoubiquitination in the chromatin of FLOWERING LOCUS regulates flowering time in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20, 2586–2602. doi:10.1105/tpc.108.062760
- Cao**, X., and Jacobsen, S.E. (2002). Role of the *Arabidopsis* DRM methyltransferases in de novo DNA methylation and gene silencing. *Curr. Biol.* 12, 1138–1144. doi: 10.1016/S0960-9822(02)00925-9
- Charlesworth**, B. & Jain, K. (2014). Purifying selection, drift, and reversible mutation with arbitrarily high mutation rates. *Genetics*, 198 (4), 1587–1602.
- Chen**, Z., Zhang, H., Jablonowski, D., Zhou, X., Ren, X., Hong, X., Schaffrath, R., Zhu, J.-K., and Gong, Z. (2006). Mutation in ABO1/ELO2, a subunit of Holo-Elongator, increase abscisic acid sensitivity and drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Cell. Biol.* 26, 6902-6912.
- Chiappetta** A, Muto A, Bruno L, Wołoszyńska M, Van Lijsebettens M, Bitonti MB. 2015 A dehydrin gene isolated from feral olive enhances drought tolerance in *Arabidopsis* transgenic plants. *Front Plant Sci.* 30;6:392
- Cokus**, S.J., Feng, S., Zhang, X., Chen, Z., Merriman, B., Haudenschild, C. D. et al. (2008). Shotgun bisulphite sequencing of the *Arabidopsis* genome reveals DNA methylation patterning. *Nature*, 452, 215–219.
- Colville**, A., Alhatab, R., Hu, M., Labbe, H., Xing, T., Miki, B., 2011. Role of HD2 genes in seed germination and early seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Rep.* 30, 1969e1979.
- Cubas** P, Vincent C, Coen E. 1999 An epigenetic mutation responsible for natural variation in floral symmetry. *Nature*, 401:157-161.
- DeFraia**, C.T., Wang, Y., Yao, J., and Mou, Z. (2013). Elongator subunit 3 positively regulates plant immunity through its histone acetyltransferase and radical S-adenosylmethionine domains. *BMC Plant Biol.* 13, 102.
- DeFraia**, C.T., Zhong, X., and Mou, Z. (2010). Elongator subunit 2 is an accelerator of immune responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 64, 511-523.
- Dhawan**, R., Luo, H., Foerster, A.M., AbuQamar, S., Du, H.-N., Briggs, S.D., Mittelsten Scheid, O. and Mengiste, T. (2009) HISTONE MONOUBIQUITINATION1 interacts with a subunit of the mediator complex and regulates defense against necrotrophic fungal pathogens in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21, 1000-1019.
- Du** J, Zhong X, Bernatavichute YV, Stroud H, Feng S, Caro E, Vashisht AA, Terragni J, Chin HG, Tu A, Hetzel J, Wohlschlegel JA, Pradhan S, Patel DJ, Jacobsen SE 2012 Dual binding of chromomethylase domains to H3K9me2-containing nucleosomes directs DNA methylation in plants. *Cell* 151:167-180.
- Dürr**, J., Lolas, I.B., Sørensen, B.B., Schubert, V., Houben, A., Melzer, M., Deutzmann, R., Grasser, M., and Grasser, K.D. (2014). The transcript elongation factor SPT4/SPT5 is involved in auxin-related gene expression in *Arabidopsis*. *Nucleic Acids Res.* 42, 4332-4347.
- Elhamamsy** AR. DNA methylation dynamics in plants and mammals: overview of regulation and dysregulation. (2016) *Cell Biochem Funct* 34:289–298.
- Faik**, A., Jiang, N. and Held, M. A. (2014). Xylan biosynthesis in plants, simply complex. In *Plants and BioEnergy*, Advances in Plant Biology, Vol. 4 (ed. M. C. McCann, M. S. Buckeridge and N. Carpita), pp. 153-181. New York, Springer Verlag.
- Falcone**, A., Nelissen, H., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., and Bitonti, M.B. (2007). Cytological investigations of the *Arabidopsis thaliana* *elo1* mutant give new insights into leaf lateral growth and Elongator function. *Ann. Bot.* 100, 261-270.
- Finnegan** EJ, Kovac KA: Plant DNA methyltransferases. *Plant Mol Biol* 2000, 43:189-201.
- Fleury** D, et al. (2007) The *Arabidopsis thaliana* homolog of yeast *BRE1* has a function in cell cycle regulation during early leaf and root growth. *Plant Cell* 19(2), 417-432.
- Furrow** R.E. 2014 Epigenetic inheritance, epimutation, and the response to selection. *PLoS One*, 9, 7–10.
- Gangappa**, S. N., Crocco, C. D., Johansson, H., Datta, S., Hettiarachchi, C., Holm, M. and Botto, J. F. 2013 The *Arabidopsis* B-BOX protein BBX25 interacts with HY5, negatively regulating *BBX22* expression to suppress seedling photomorphogenesis. *Plant Cell* 25, 1243-1257.
- Gent** JI, Ellis NA, Guo L, Harkess AE, Yao Y, Zhang X, Dawe RK. (2013) CHH islands: de novo DNA methylation in near-gene chromatin regulation in maize. *Genome Res*, 23:628-637.
- Gu**, X., Jiang, D., Wang, Y., Bachmair, A. and He, Y. 2009 Repression of the floral transition via histone H2B monoubiquitination. *Plant J.* 57, 522-533.
- Hauben** M, Haesendonckx B, Standaert E, Van Der Kelen K, Azmi A, Akpo H, Van Breusegem F, Guisez Y, Bots M, Lambert B, Laga B, De Block M: Energy use efficiency is characterized by an epigenetic component that can be directed through artificial selection to increase yield. *Proc Natl Acad Sci USA* 2009, 106:20109-20114.
- Hawkes** NA, et al. 2002 Purification and characterization of the human elongator complex. *J Biol Chem* 277:3047-3052.
- Hématy**, K., Sado, P.-E., Van Tuinen, A., Rochange, S., Desnos, T., Balzergue, S., Pelletier, S., Renou, J.-P. and Höfte, H. (2007). A receptor-like kinase mediates the response of *Arabidopsis* cells to the inhibition of cellulose synthesis. *Curr. Biol.* 17, 922-931.
- Himanen**, K., Wołoszyńska, M., Boccardi, T.M., De Groeve, S., Nelissen, H., Bruno, L., Vuylsteke, M., and Van Lijsebettens, M. (2012). Histone H2B monoubiquitination is required to reach maximal transcript levels of circadian clock genes in *Arabidopsis*. *Plant J.* 72, 249-260.

- Hwang, W.W., Venkatasubrahmanyam, S., Ianculescu, A.G., Tong, A., Boone, C. and Madhani, H.D.** 2003 A conserved RING finger protein required for histone H2B monoubiquitination and cell size control. *Mol. Cell*, 11, 261-266.
- Jacobsen SE, Meyerowitz EM.** (1997) Hypermethylated SUPERMAN epigenetic alleles in *Arabidopsis*. *Science*, 277:1100-1103.
- Janska H, Sarria R, Wołoszyńska M, Arrieta-Montiel M, Mackenzie S.** 1998. Stoichiometric shifts in the common bean mitochondrial genome leading to male sterility and spontaneous reversion to fertility. *The Plant Cell*, 10: 1163-1180
- Johannes F, Porcher E, Teixeira FK, Saliba-Colombani V, Simon M, Agier N, Bulski A, Albuissou J, Heredia F, Audigier P, Bouchez D, Dillmann C, Guerche P, Hospital F, Colot V.** (2009) Assessing the impact of transgenerational epigenetic variation on complex traits. *PLoS Genet*, 5:e1000530.
- Kidner, C.A., Martienssen, R.A.,** 2004. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428, 81e84.
- Kmieć B, Drynda R, Wołoszyńska M.** 2005. Molecular basis of plants response to low temperature. *Biotechnologia* 3: 184 – 200.
- Kmieć B, Wołoszyńska M, Janska H.** 2006. Heteroplasmy as a common state of mitochondrial genetic information in plants and animals. *Current Genetics*, 50: 149-59
- Kojima, S., Iwasaki, M., Takahashi, H., Imai, T., Matsumura, Y., Fleury, D., Van Lijsebettens, M., Machida, Y., and Machida, C.** (2011). ASYMMETRIC LEAVES2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 52, 1259-1273.
- Krogan NJ and Greenblatt JF** (2001) Characterization of a six-subunit holo-elongator complex required for the regulated expression of a group of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 21:8203-8212.
- Lally, D., Ingmire, P., Tong, H.-Y. and He, Z.-H.** (2001). Antisense expression of a cell wall-associated protein kinase, WAK4, inhibits cell elongation and alters morphology. *Plant Cell* 13, 1317-1331.
- Leitner, J., Retzer, K., Malenica, N., Bartkewicute, R., Lucyshyn, D., Jäger, G., Korbei, B., Byström, A., and Luschnig, C.** (2015). Meta-regulation of *Arabidopsis* auxin responses depends on tRNA maturation. *Cell Rep.* 11, 516-526.
- Leivar, P., Tepperman, J. M., Cohn, M. M., Monte, E., Al-Sady, B., Erickson, E. and Quail, P. H.** (2012). Dynamic antagonism between phytochromes and PIF family basic helix-loop-helix factors induces selective reciprocal responses to light and shade in a rapidly responsive transcriptional network in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24, 1398-1419.
- Li, Q. F., and He, J. X.** (2016). BZR1 interacts with HY5 to mediate brassinosteroid- and light-regulated cotyledon opening in *Arabidopsis* in darkness. *Mol. Plant*. 9, 113-125.
- Lister R, O'Malley RC, Tonti-Filippini J, Gregory BD, Berry CC, Millar AH, Ecker JR.** (2008) Highly integrated single-base resolution maps of the epigenome in *Arabidopsis*. *Cell*, 133:523-536.
- Liu ZL, Han FP, Tan M, Shan XH, Dong YZ, Wang XZ, Fedak G, Hao S, Liu B.** (2004) Activation of a rice endogenous retrotransposon Tos17 in tissue culture is accompanied by cytosine demethylation and causes heritable alteration in methylation pattern of flanking genomic regions. *Theor Appl Genet*, 109:200-209.
- Liu Y, Koornneef M, Soppe WJJ** (2007) The absence of histone H2B monoubiquitination in the *Arabidopsis hub1 (rdo4)* mutant reveals a role for chromatin remodeling in seed dormancy. *Plant Cell* 19(2), 433-444.
- Lozano-Durán, R., Macho, A. P., Boutrot, F., Segonzac, C., Somssich, I. E. and Zipfel, C.** (2013). The transcriptional regulator BZR1 mediates trade-off between plant innate immunity and growth. *eLife* 2, e00983.
- Majewski P, Wołoszyńska M, Janska H.** 2009. Developmentally early and late onset of Rps10 silencing in *Arabidopsis thaliana*: genetic and environmental regulation. *Journal of Experimental Botany* 60:1163-78
- Manning, K. et al.** (2006) A naturally occurring epigenetic mutation in a gene encoding an SBP-box transcription factor inhibits tomato fruit ripening. *Nat. Genet.* 38, 948–952
- Meng D, Dubin M, Zhang P, Osborne EJ, Stegle O, Clark RM, Nordborg M: Limited Contribution of DNA Methylation Variation to Expression Regulation in *Arabidopsis thaliana*.** *PLoS Genet* 2016, 12:e1006141.
- Miedes, E., Vanholme, R., Boerjan, W. and Molina, A.** (2014). The role of the secondary cell wall in plant resistance to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5, 358.
- Miura, K., Agetsuma, M., Kitano, H., Yoshimura, A., Matsuoka, M., Jacobsen, S.E., et al.** (2009) A metastable DWARF1 epigenetic mutant affecting plant stature in rice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 11218–11223.
- Miura, K., Ikeda, M., Matsubara, A., Song, X.J., Ito, M., Asano, K., et al.** (2010). OsSPL14 promotes panicle branching and higher grain productivity in rice. *Nat. Genet.* 42, 545–549.
- Nelissen, H., Boccardi, T.M., Himanen, K., and Van Lijsebettens, M.** (2007). Impact of core histone modifications on transcriptional regulation and plant growth. *Crit. Rev. Plant Sci.* 26, 243-263.
- Nelissen, H., Clarke, J.H., De Block, M., De Block, S., Vanderhaeghen, R., Zielinski, R.E., Dyer, T., Lust, S., Inzé, D., and Van Lijsebettens, M.** (2003). DRL1, a homolog of the yeast TOT4/KTI12 protein, has a function in meristem activity and organ growth in plants. *Plant Cell* 15, 639-654.
- Nelissen H, De Groeve S, Fleury D, Neyt P, Bruno L, Bitonti MB, Vandebussche F, Van der Straeten D, Yamaguchi T, Tsukaya H, Witters E, De Jaeger G, Houben A, Van Lijsebettens M** (2010) Plant Elongator regulates auxin-related genes during RNA polymerase II transcription elongation. *Poc Natl Acad Sci USA* 107: 1678-1683.
- Nelissen H, Fleury D, Bruno L, Robles P, De Veylder L, Traas J, Micol HL, Van Montagu M, Inze D and Van Lijsebettens M** (2005) The elongata mutants identify a functional Elongator complex in plants with a role in cell proliferation during organ growth. *Poc Natl Acad Sci USA* 102:7754-7759.
- Nixdorf, M. and Hoecker, U.** (2010). SPA1 and DET1 act together to control photomorphogenesis throughout plant development. *Planta* 231, 825-833.
- Nozue, K., Covington, M. F., Duek, P. D., Lorrain, S., Fankhauser, C., Harmer, S. L., Maloof, J. N.** (2007). Rhythmic growth explained by coincidence between internal and external cues. *Nature* 448, 358-361.
- Oh, E., Zhu, J.-Y., Bai, M.-Y., Arenhart, R. A., Sun, Y. and Wang, Z.-Y.** (2014). Cell elongation is regulated through a central circuit of interacting transcription factors in the *Arabidopsis* hypocotyl. *eLife* 3, e03031.
- Pandey R, Müller A, Napoli CA, Selinger DA, Pikaard CS, Richards EJ, Bender J, Mount DW, Jorgensen RA** (2002) Analysis of histone acetyltransferase and histone deacetylase families of *Arabidopsis thaliana* suggests functional diversification of chromatin modification among multicellular eukaryotes. *Nucleic Acids Res* 30:5036-5055.
- Paprocka M, Wołoszyńska M.** 2004. Posttranscriptional gene silencing in plants. *Kosmos*, 2: 193-200.
- Rojas, C. M., Senthil-Kumar, M., Tzin, V. and Mysore, K. S.** (2014). Regulation of primary plant metabolism during plant-pathogen interactions and its contribution to plant defense. *Front. Plant Sci.* 5, 17.
- Roudier F, et al.** (2011) Integrative epigenomic mapping defines four main chromatin states in *Arabidopsis*. *EMBO J* 30(10), 1928-1938.

- Sanmartín, M., Sauer, M., Muñoz, A., Zouhar, J., Ordóñez, A., van de Ven, W.T.G., Caro, E., de la Paz Sánchez, M., Raikhel, N.V., Gutiérrez, C., Sánchez-Serrano, J.J., and Rojo, E. (2011).** A molecular switch for initiating cell differentiation in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 21, 999-1008.
- Saze H, Tsugane K, Kanno T, Nishimura T. 2012** DNA methylation in plants: relationship to small RNAs and histone modifications, and functions in transposon inactivation. *Plant Cell Physiol* 53:766-784.
- Schöb H, Grossniklaus U. 2006** The first high-resolution DNA "methylome". *Cell* 126:1025-1028.
- Schmitz RJ, Schultz MD, Lewsey MG, O'Malley RC, Ulrich MA, Libiger O, Schork NJ, Ecker JR. 2011** Transgenerational epigenetic instability is a source of novel methylation variants. *Science* 334:369-373.
- Servet, C., Conde e Silva, Na, Zhou, D.X., 2010.** Histone acetyltransferase AtGCN5/HAG1 is a versatile regulator of developmental and inducible gene expression in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 3, 670e677.
- Shahbazian, M. D. and Grunstein M. (2007)** Functions of site-specific histone acetylation and deacetylation. *Annu Rev Biochem* 76: 75–100.
- Shen Y, Wei W, Zhou DX. 2015** Histone acetylation enzymes coordinate metabolism and gene expression. *Trends in Plant Science* 20, 614–621.
- Skylar, A., Matsuwaka, S., and Wu, X. (2013).** *ELONGATA3* is required for shoot meristem cell cycle progression in *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Dev. Biol.* 382, 436-445.
- Slatkin M. 2009** Epigenetic inheritance and the missing heritability problem. *Genetics*, 182, 845–850.
- Stroud H, Do T, Du J, Zhong X, Feng S, Johnson L, Patel DJ, Jacobsen SE: 2014** Non-CG methylation patterns shape the epigenetic landscape in *Arabidopsis*. *Nat Struct Mol Biol* 2014, 21:64-72.
- Takuno S, Gaut BS 2012** Body-methylated genes in *Arabidopsis thaliana* are functionally important and evolve slowly. *Mol Biol Evol* 29:219-227.
- Tanaka, M., Kikuchi, A., Kamada, H., 2008.** The *Arabidopsis* histone deacetylases HDA6 and HDA19 contribute to the repression of embryonic properties after germination. *Plant Physiol.* 146, 149e161.
- Tian, L., Chen, Z.J., 2001.** Blocking histone deacetylation in *Arabidopsis* induces pleiotropic effects on plant gene regulation and development. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98, 200e205.
- Tian, L., Fong, M.P., Wang, J.J., Wei, N.E., Jiang, H., Doerge, R.W., Chen, Z.J., 2005.** Reversible histone acetylation and deacetylation mediate genome-wide, promoter-dependent and locus-specific changes in gene expression during plant development. *Genetics* 169, 337e345.
- Tian, L., Wang, J., Fong, M.P., Chen, M., Cao, H., Gelvin, S.B., Chen, Z.J., 2003.** Genetic control of developmental changes induced by disruption of *Arabidopsis* histone deacetylase 1 (*AtHD1*) expression. *Genetics* 165, 399e409.
- To, T.K., Kim, J.M., Matsui, A., Kurihara, Y., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T., Kakutani, T., Toyoda, T., Kimura, H., Yokoyama, S., Shinozaki, K., Seki, M., 2011.** *Arabidopsis* HDA6 regulates locus-directed heterochromatin silencing in cooperation with MET1. *PLoS Genet.* 7, e1002055.
- Ueno, Y., Ishikawa, T., Watanabe, K., Terakura, S., Iwakawa, H., Okada, K., Machida, C., Machida, Y., 2007.** Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19, 445e457.
- Van Lijsebettens M, Dürr J, Wołoszynska M, Grasser KD. 2014** Elongator and SPT4/SPT5 complexes as proxy to study RNA polymerase II transcript elongation control of plant development. *Proteomics*. 14(19):2109-2114
- Verkest A, Byzova M, Martens C, Willems P, Verwulgen T, Slabbinck B, Rombaut D, Van de Velde J, Vandepoele K, Standaert E, Peeters M, Van Lijsebettens M, Van Breusegem F, De Block M 2015** Selection for improved energy use efficiency and drought tolerance in canola results in distinct transcriptome and epigenome changes. *Plant Physiol* 168:1338-1350.
- Waddington CH 1968** Towards a theoretical biology. *Nature* , 218:525-527.
- Wang, C., Ding, Y., Yao, J., Zhang, Y., Sun, Y., Colee, J., and Mou, Z. (2015).** *Arabidopsis* Elongator subunit 2 positively contributes to resistance to the necrotrophic fungal pathogens *Botrytis cinerea* and *Alternaria brassicicola*. *Plant J.* 83, 1019-1033.
- Wang, Y., An, C., Zhang, X., Yao, J., Zhang, Y., Sun, Y., Yu, F., Amador, D.M., and Mou, Z. (2013).** The *Arabidopsis* Elongator complex subunit2 epigenetically regulates plant immune responses. *Plant Cell* 25, 762-776.
- Wang, Z., Cao H., Chen, F., Liu, Y. (2014)** The roles of histone acetylation in seed performance and plant development. *Plant Physiology and Biochemistry* 84 (2014) 125-133
- Winkler GS, Kristjahan A, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Svejstrup JQ (2002)** Elongator is a histone H3 and H4 acetyltransferase important for normal histone acetylation levels in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 99:3517-3522.
- Wołoszynska M. 2010** Heteroplasmy and stoichiometric complexity of plant mitochondrial genomes – though this be madness, yet there's method in't. *Journal of Experimental Botany*, 61: 657-71,
- Wołoszynska M, Bocser T, Mackiewicz P, Jańska H. 2004.** A fragment of chloroplast DNA was transferred horizontally, probably from non-eudicots, to mitochondrial genome of *Phaseolus*. *Plant Molecular Biology* 56: 811-820.
- Wołoszynska M, Gagliardi O, Vandenbussche F, De Groeve S, Alonso Baez L, Neyt P, Le Gall S, Fung J, Mas P, Van Der Straeten D and Van Lijsebettens M. (2018a)** The Elongator complex regulates hypocotyl growth in darkness and during photomorphogenesis. *J Cell Sci* 131.
- Wołoszynska, M., Gagliardi, O., Vandenbussche, F., Van Lijsebettens, M. 2018b** Elongator promotes germination and early post-germination growth. *Plant Signaling and Behavior* 13
- Wołoszynska M, Gola EM, Piechota J. 2012.** Changes in accumulation of heteroplasmic mitochondrial DNA and frequency of recombination via short repeats during plant lifetime in *Phaseolus vulgaris*. *Acta Biochimica Polonica* 59: 703 – 709.
- Wołoszynska M, Kanczewska J, Drabkin A, Dambly S, Maudoux O, Boutry M 2003.** Function and regulation of the two major plasma membrane H⁺-ATPases. *Ann New York Acad Sci*, 986: 1-6.
- Wołoszynska M, Kieleczawa J, Ornatowska M, Woźniak M, Jańska H. 2001.** The origin and maintenance of the small repeat in the bean mitochondrial genome. *Molecular Genetics and Genomics* 265, 865-872.
- Wołoszynska M, Kmiec B, Mackiewicz P, Jańska H. 2006.** Copy number of bean mitochondrial genes estimated by real-time PCR does not correlate with the number of gene loci and transcript levels. *Plant Molecular Biology*, 61: 1 – 12.
- Wołoszynska, M., Le Gall S., Van Lijsebettens M. (2016)** Plant Elongator-mediated transcriptional control in a chromatin and epigenetic context. *Biochim Biophys Acta.* 8, 1025-1033.
- Wołoszynska M, Oziemlak A, Janska H. 2001.** Heteroplasmy in plants. *Biotechnologia* 1, 42-47.
- Wołoszynska M, Trojanowski D. 2009.** Counting mtDNA molecules in *Phaseolus vulgaris*: sublimons are constantly produced by recombination via short repeats and undergo rigorous selection during substoichiometric shifting. *Plant Molecular Biology* 70: 511-521.
- Wu, K., Tian, L., Malik, K., Brown, D., Miki, B., 2000.** Functional analysis of HD2 histone deacetylase homologues in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 22, 19e27. Xiao et al., 2005
Xie et al., 2015

- Xu L.**, et al. (2009) The E2 ubiquitin-conjugating enzymes, AtUBC1 and AtUBC2, play redundant roles and are involved in activation of *FLC* expression and repression of flowering in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 57(2), 279-288.
- Xu, D.**, Huang, W., Li, Y., Wang, H., Huang, H., and Cui, X. (2012). Elongator complex is critical for cell cycle progression and leaf patterning in *Arabidopsis*. *Plant J*. 69, 792-808.
- Yano, R.**, Takebayashi, Y., Nambara, E., Kamiya, Y., Seo, M., 2013. Combining association mapping and transcriptomics identify HD2B histone deacetylase as a genetic factor associated with seed dormancy in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*. 74, 815e828.
- Zhang X**, Yazaki J, Sundaresan A, Cokus S, Chan SW, Chen H, Henderson IR, Shinn P, Pellegrini M, Jacobsen SE, Ecker JR: Genome-wide high-resolution mapping and functional analysis of DNA methylation in *Arabidopsis*. *Cell* 2006, 126:1189-1201.
- Zhang, H.**, He, H., Wang, X., Wang, X., Yang, X., Li, L. and Deng, X. W. (2011). Genome-wide mapping of the *HY5*-mediated gene networks in *Arabidopsis* that involve both transcriptional and post-transcriptional regulation. *Plant J*. 65, 346-358.
- Zhou, X.**, Hua, D., Chen, Z., Zhou, Z., and Gong, Z. (2009). Elongator mediates ABA responses, oxidative stress resistance and anthocyanin biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant J*. 60, 79-90.
- Zhou, Y.**, Tan, B., Luo, M., Li, Y., Liu, C., Chen, C., Yu, C.W., Yang, S., Dong, S., Ruan, J., Yuan, L., Zhang, Z., Zhao, L., Li, C., Chen, H., Cui, Y., Wu, K., Huang, S., 2013. HISTONE DEACETYLASE19 interacts with HSL1 and participates in the repression of seed maturation genes in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell* 25, 134e148.
- Zimmermann, P.**, Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004). GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol*. 136, 2621-2632.

Wrocław, 26 czerwca 2018

Magdalena Wołoszyńska