**Julia Dłużewska**

**Kontrola crossing-over poprzez białko MSH2 wykrywające nieprawidłowo dopasowane pary zasad DNA w odpowiedzi na wzór chromosomowej heterozygotyczności u *Arabidopsis thaliana***

Podczas mejozy chromosomy homologiczne łączą się w pary i wzajemnie wymieniają materiałem genetycznym w procesie zwanym crossing-over lub rekombinacją mejotyczną. Crossing-over jest ważne dla generowania nowych kombinacji alleli, a co najmniej jedno crossing-over na biwalent jest niezbędne do zapewnienia właściwej segregacji chromosomów w mejozie. Co więcej, rozmieszczenie zdarzeń crossing-over nie jest przypadkowe, a ich liczba jest limitowana – na jedną parę chromosomów podczas mejozy przypada tylko około 2-3 crossing-over, niezależnie od fizycznej wielkości genomu.

Jednym z czynników wpływających na rozmieszczenie rekombinacji jest polimorfizm pomiędzy chromosomami homologicznymi. Obecność regionu heterozygotycznego obok regionu homozygotycznego na tym samym chromosomie powoduje redystrybucję crossing-over do regionu polimorficznego. Pokazałam, że ów efekt zestawienia heterozygotyczności *in cis* (ang. *heterozygosity juxtaposition effect*), zależy od aktywności białka MSH2, kluczowego elementu systemu naprawy nieprawidłowo sparowanych zasad DNA. Moje wyniki wykazują stymulującą rolę MSH2 w tworzeniu crossing-over klasy I. Dzięki całogenomowej analizie crossing-over w mieszańcach z mutacją msh2 wykazałam, że rekombinacja jest redystrybuowana z wysoce polimorficznych regionów okołocentromerowych do mniej polimorficznych regionów przytelomerowych. Interferencja genetyczna nie uległa zmianie w mutancie msh2 w liniach wsobnych i mieszańcowych.

Korzystając z panelu linii *Arabidopsis thaliana* znakowanych fluorescencyjnie (ang. fluorescent-tagged line, FTL) wykazałam, że wzór rekombinacji jest w znacznej mierze podobny między liniami wsobnymi i mieszańcami, jednak obecność regionu heterozygotycznego na w innym wypadku homozygotycznym chromosomie przekierowuje zdarzenia crossing-over do regionu heterozygotycznego. Wzrost rekombinacji obserwuje się głównie w pobliżu granicy pomiędzy regionem heterozygotycznym i homozygotycznym, podczas gdy spadek zdarzeń crossing-over w części homozygotycznej obejmuje cały ten region. Protokół opisujący wykorzystanie FTL w pomiarach częstotliwości rekombinacji również stanowi część mojej rozprawy doktorskiej.

Zdarzenia crossing-over klasy II są wrażliwe na obecność polimorfizmu i z tego powodu nie są wydajnie formowane w regionach heterozygotycznych. W mieszańcach, w których aktywna jest wyłącznie klasa II (podwójny mutant fancm zip4) przyczyną obniżonej płodności jest niedobór crossing-over. Poprzez dodatkową inaktywację MSH2 zwiększyłam płodność roślin. Co więcej, moje całogenomowe analizy crossing-over w tle różnych mutantów, w tym w msh2 fancm i msh2 recq4, w połączeniu z pomiarami częstości rekombinacji przy użyciu FTL ujawniły, że MSH2 ogranicza zachodzenie crossing-over klasy II. MSH2 wykazuje więc przeciwstawne działanie w dwóch szlakach crossing-over. W regionach około-centromerowych, które są znacznie bardziej polimorficzne niż reszta chromosomu, inaktywacja MSH2 nie spowodowała zwiększenia częstości crossing-over klasy II w regionach heterozygotycznych. To pokazuje, że polimorfizm może mieć również niezależny od MSH2 wpływ na rekombinację.

Ponadto, nadekspresja pro-rekombinacyjnego czynnika HEI10 spowodowała znaczny wzrost rekombinacji we wszystkich testowanych wariantach heterozygotyczności, z wciąż obecną tendencją regionów heterozygotycznych do stymulowania zdarzeń crossing-over. Wykazałam, że w msh2 HEI10-OE rekombinacja jest zwiększona globalnie z powodu promowania klasy I przez HEI10, jednak nie obserwuje się efektu zestawienia heterozygotyczności in cis. Co więcej, w wariancie msh2 fancm zip4 HEI10-OE nie wykryto stymulowania crossing-over przez HEI10, co dowodzi, że HEI10 nie odgrywa żadnej roli w klasie II.

Podsumowując, wykazałam pro-rekombinacyjną rolę MSH2 dla crossing-over klasy I oraz antagonistyczną, anty-rekombinacyjną rolę dla crossing-over klasy II. Moja praca pokazuje, że MSH2 jest głównym regulatorem dla obu szlaków crossing-over, co pozwala na dynamiczną regulację rekombinacji mejotycznej, w zależności od poziomu i rozkładu heterozygotyczności pomiędzy chromosomami homologicznymi.