

**AUTOREFERAT****IMIĘ I NAZWISKO****Rafał Milanowski****POSIADANE DYPLOMY I STOPNIE NAUKOWE**

- 2004: Uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
  - Tytuł pracy: Filogeneza euglenin (Euglenophyceae) i ich chloroplastów w świetle analizy znaczników molekularnych
  - Promotor: prof. dr hab. Bożena Zakryś
  - Recenzenci: prof. dr hab. Ewa Bartnik i prof. dr hab. Iwo Wojciechowski
  
- 1999: Uzyskanie tytułu magistra (kierunek biologia molekularna), Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
  - Tytuł pracy: Zastosowanie metod amplifikacji DNA do szybkiej analizy sekwencji nukleotydowych wybranych obszarów genomów
  - Promotor: prof. dr hab. Piotr Węgleński

**INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH**

- Od 2016: asystent, Zakład Filogenetyki Molekularnej i Ewolucji, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
  
- 2004-2016: adiunkt, Zakład Systematyki i Geografii Roślin, Wydział Biologii Uniwersytetu Warszawskiego
  
- 1999-2003: studia doktoranckie na Wydziale Biologii Uniwersytetu Warszawskiego

WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM

TYTUŁ OSIĄGNIĘCIA NAUKOWEGO

## Ewolucja i charakterystyka intronów niekonwencjonalnych w genach jądrowych euglenin

SPIS PUBLIKACJI WCHODZĄCYCH W SKŁAD DZIEŁA HABILITACYJNEGO

W nawiasie kwadratowym podano punktację MNiSW, wartość IF, wartość 5-letniego IF dla czasopisma z roku opublikowania artykułu lub z najbardziej aktualnej listy oraz liczbę cytowań wg baz danych Web of Science (WoS), Scopus i Google Scholar (Google).

1. Milanowski R., Karnkowska A., Ishikawa T., Zakryś B. (2014). Distribution of conventional and non-conventional introns in tubulin (alpha and beta) genes of euglenids. *Mol Biol Evol* 31: 584-593 [MNiSW<sub>2014</sub>: **45**; IF<sub>2014</sub>: **9,105**; IF-5<sub>2014</sub>: **11,667**; CYT<sub>WoS</sub>: **7**; CYT<sub>Scopus</sub>: **8**; CYT<sub>Google</sub>: **12**].
2. Milanowski R., Gumińska N., Karnkowska A., Ishikawa T., Zakryś B. (2016). Intermediate introns in nuclear genes of euglenids – are they a distinct type? *BMC Evol Biol* 16:49 [MNiSW<sub>2016</sub>: **30**; IF<sub>2016</sub>: **3,221**; IF-5<sub>2016</sub>: **3,628**; CYT<sub>WoS</sub>: **3**; CYT<sub>Scopus</sub>: **3**; CYT<sub>Google</sub>: **6**].
3. Gumińska N., Płecha M., Zakryś B., Milanowski R. (2018). Order of removal of conventional and nonconventional introns from nuclear transcripts of *Euglena gracilis*. *PLoS Genetics* 14 (10): e1007761 [MNiSW<sub>2016</sub>: **45**; IF<sub>2017</sub>: **5,540**; IF-5<sub>2017</sub>: **6,684**; CYT<sub>WoS</sub>: **0**; CYT<sub>Scopus</sub>: **0**; CYT<sub>Google</sub>: **0**].

### DANE SCJENTOMETRYCZNE DLA OSIĄGNIĘCIA HABILITACYJNEGO

Sumaryczny IF: **17,866**

Sumaryczny IF-5: **21,979**

Liczba cytowań wg WoS: **10**; wg Scopus: **11**; wg Google Scholar: **18**

Suma punktów MNiSW: **120**

## OMÓWIENIE CELU NAUKOWEGO WYMIENIONYCH PRAC I OSIĄGNIĘTYCH WYNIKÓW

Eugleniny (Euglenida) są monofiletyczną grupą wolnożyjących, jednokomórkowych wiciowców występujących w środowisku wodnym, głównie w niewielkich, astatycznych zbiornikach śródlądowych. Są one blisko spokrewnione z symbiontydami (Symbiontida, wolnożyjące wiciowce zamieszkujące głównie ubogie w tlen osady morskie), diplomemidami (Diplonemea, głównie wolnożyjące wiciowce morskie) i kinetoplastydami (Kinetoplastea, wolnożyjące oraz pasożytnicze wiciowce, m.in. Trypanosomatydy). Eugleniny, symbiontydy, diplomemidy oraz kinetoplastydy zaliczane są do grupy Euglenozoa (Cavalier-Smith 1981; Breglia i wsp. 2010; Burki 2014). Zarówno na podstawie analiz morfologicznych jak i molekularnych grupę Euglenozoa zalicza się do jednej z pięciu głównych super-grup eukariontów – Excavata (Hampl i wsp. 2009; Yabuki i wsp. 2011; Adl i wsp. 2012; Burki 2014), aczkolwiek niektóre badania wskazują, że Euglenozoa jest pierwszą, najstarszą grupą, która odłączyła się od głównej linii ewolucyjnej eukariontów (Cavalier-Smith 2010; Burki 2014). W obrębie euglenin obserwujemy wiele różnych sposobów odżywiania się. Większość z nich to wiciowce heterotroficzne (bakteriożerne, eukariożerne lub osmotroficzne), są jednak wśród nich także posiadające chloroplasty gatunki fotoautotroficzne. Powstanie euglenin fotoautotroficznych (Euglenea) było efektem niezwykłego zdarzenia ewolucyjnego – drugorzędowej endosymbiozy pomiędzy eukariożerną eugleniną heterotroficzną, a jednokomórkową zielenicą, blisko spokrewnioną ze współcześnie żyjącymi przedstawicielami rodzaju *Pyramimonas* (Turmel i wsp. 2009; Hrda i wsp. 2012).

Nasza wiedza na temat organizacji jądrowego materiału genetycznego euglenin jest ciągle ograniczona. Co zaskakujące, nieznana jest nawet dokładna liczba chromosomów u najlepiej zbadanego gatunku modelowego *Euglena gracilis* (Dooijes i wsp. 2000). Od kilku lat realizowany jest projekt mający na celu poznanie sekwencji genomu jądrowego *E. gracilis*, ale jego efekty ciągle nie są satysfakcjonujące. Powodem jest niespodziewanie duża wielkość genomu (ok. 2 Gb) i wysoki poziom sekwencji powtarzalnych (Ebenezer i wsp. 2017). W organizacji genomu jądrowego euglenin oraz w procesach dojrzewania ich RNA obserwujemy kilka niespotykanych rozwiązań. Na przykład, geny rRNA są zlokalizowane na pozachromosomalnych, kolistych cząsteczkach obecnych w komórce w setkach, tysiącach kopii (Cook and Roxby 1985; Ravel-Chapuis 1988). Nie ma jednej cząsteczki 28S rRNA, w zamian trzynaście krótkich cząsteczek rRNA tworzy jej ekwiwalent (Schnare and Gray 1990). Warto wspomnieć również o tym, że część jądrowych transkryptów podlega w trakcie dojrzewania *trans*-splicingowi. W procesie tym tzw. splice-leader jest przyłączany na końcu 5' transkryptu w miejsce outronu, niepełnej sekwencji intronowej (brak końca GT) zawierającej punkt rozgałęzienia A, trakt polipirymidynowy oraz koniec AG (Ebel i wsp. 1999). Jednak najbardziej bezprecedensową cechą genów jądrowych euglenin jest obecność w nich dwóch typów intronów: konwencjonalnych intronów spliceosomalnych, posiadających kanoniczne końce GT/C-AG (u euglenin obecny jest tylko spliceosom typu U2) oraz intronów niekonwencjonalnych, dla których nieznany jest mechanizm usuwania (niekanoniczne i niekonserwowane końce, zdolność do tworzenia stabilnej struktury drugorzędowej na poziomie RNA zbliżającej końce intronu i sąsiadujących eksonów). Intryny

niekonwencjonalne zostały wykryte także w genach jądrowych morskich diplonemidów, bliskich krewnych euglenin i jednych z najbardziej rozpowszechnionych organizmów eukariotycznych w oceanach (deVargas i wsp. 2015; Flegontova i wsp. 2016). Co ciekawe, jak dotąd nie wykryto u tych organizmów intronów konwencjonalnych (Gawryluk i wsp. 2016). Jednak introny niekonwencjonalne euglenin pozostają ciągle najlepiej zbadanymi elementami tego typu. Wiedza na ich temat jest jednak niewystarczająca, ciągle nieznanym jest mechanizm ich wycinania ani żadne czynniki zaangażowane w ten proces. Wydaje się, że są usuwane przez mechanizm niezwiązany ze spliceosomem, ponieważ brak na ich końcu 5' sekwencji komplementarnej do U1 snRNA (Breckenridge i wsp. 1999). Wiadomo jedynie, że wszystkie introny tego typu tworzą stabilną strukturę drugorzędową RNA zbliżającą złącza ekson-intron, co jest najprawdopodobniej niezbędne do ich prawidłowego wycięcia. Aczkolwiek w strukturze tej nie obserwuje się żadnych cech wspólnych z samowycinającymi się intronami grup I, II lub III, ani z intronami tRNA (Muchhal and Schwartzbach 1994; Henze i wsp. 1995; Tessier i wsp. 1995; Canaday i wsp. 2001). Ponieważ większość intronów niekonwencjonalnych posiada powtórzenia na złączach ekson-intron, to dokładne zdefiniowanie ich pozycji w genach i transkryptach jest bardzo trudne. Przeprowadzono badania porównujące kolejność usuwania outronu i pierwszego intronu *cis* w genach posiadających wyłącznie introny niekonwencjonalne (*rbcS*) lub tylko konwencjonalne (*tubG*). Uzyskane wyniki wskazują, że w genie *rbcS* niekonwencjonalny *cis*-splicing zachodzi szybciej niż konwencjonalny *trans*-splicing (Tessier i wsp. 1995), z kolei w genie *tubG* konwencjonalny *trans*-splicing zachodzi szybciej niż konwencjonalny *cis*-splicing (Canaday i wsp. 2001). Wskazuje to, że proces usuwania intronów niekonwencjonalnych jest szybki i zachodzi jeszcze przed usunięciem outronu, a usunięcie outronu i dodanie splice-leadera wyprzedza wycięcie intronów konwencjonalnych.

Występowanie intronów niekonwencjonalnych zaobserwowano początkowo w genach jądrowych pochodzenia chloroplastowego (*lhcp2*, *rbcS*; Muchhal and Schwartzbach 1994; Tessier i wsp. 1995) oraz w genie *gapC* pochodzenia bakteryjnego (Henze i wsp. 1995). Na tej podstawie wysunięto hipotezę, że introny niekonwencjonalne mogą pochodzić z genomu endosymbionta (Ebel i wsp. 1999). Później jednak odkryto introny niekonwencjonalne także w genach kodujących  $\alpha$ - i  $\beta$ - tubulinę, pochodzących z genomu gospodarza (Canaday i wsp. 2001). Analiza pozycji intronowych w genach kodujących tubuliny wykazała, że niektóre introny konwencjonalne są ewolucyjnie starymi strukturami, ponieważ występują w tych samych pozycjach u niespokrewnionych z eugleninami organizmów, tymczasem introny niekonwencjonalne są elementami stosunkowo młodymi, ponieważ występują w pozycjach unikalnych dla euglenin (Canaday i wsp. 2001). Nieco później stwierdzono występowanie intronów niekonwencjonalnych, obok konwencjonalnych intronów spliceosomalnych, w genie *hsp90* u pierwotnie heterotroficznej eugleniny *Peranema trichophorum* (Breglia i wsp. 2007). Podważyło to słuszność hipotezy o endosymbiotycznym pochodzeniu intronów niekonwencjonalnych.

Niektórzy badacze wyróżniają także trzeci typ intronów w genach jądrowych euglenin, tak zwane introny pośrednie (Canaday i wsp. 2001; Russell i wsp. 2005). Tworzą one stabilną strukturę drugorzędową RNA zbliżającą miejsca splicingowe, a jeden lub oba końce intronu są zgodne z

kanoniczną dla intronów konwencjonalnych regułą GT/C-AG. Zaobserwowano także, że w przypadku tych intronów ich koniec 5' jest w pewnym stopniu komplementarny do U1 snRNA (aczkolwiek w mniejszym stopniu niż w przypadku intronów konwencjonalnych). Wysłunięto hipotezę, że introny pośrednie mogą być formą przejściową pomiędzy intronami konwencjonalnymi i niekonwencjonalnymi (Russell i wsp. 2005).

Jak wspomniano powyżej, nasza wiedza na temat intronów niekonwencjonalnych jest ograniczona. Z tego powodu głównym celem moich badań prowadzonych w ostatnich latach było lepsze scharakteryzowanie tych nietypowych i enigmatycznych struktur, poznanie ich pochodzenia, ewolucji, mechanizmu wycinania, a także próba odpowiedzi na pytanie jaka może być ich funkcja w genach i genomach. Dotychczasowe efekty mojej pracy zostały opublikowane w przedstawionych poniżej trzech artykułach wchodzących w skład mojego dokonania naukowego.

Milanowski R., Karnkowska A., Ishikawa T., Zakryś B. (2014). Distribution of conventional and non-conventional introns in tubulin (alpha and beta) genes of euglenids. *Mol Biol Evol* 31: 584-593.

Podstawowym celem badań przedstawionych w powyższej pracy było porównanie rozmieszczenia intronów konwencjonalnych i niekonwencjonalnych w genach jądrowych euglenin w kontekście filogenetycznym. Do analizy wybrano dwa geny (*tubA* and *tubB*) opierając się na wcześniejszych doniesieniach wskazujących na obecność w nich intronów obu typów (Canaday i wsp. 2001). W badaniach uwzględniono dwadzieścia gatunków euglenin (osiemnaście fototroficznych lub wtórnie heterotroficznych oraz dwa pierwotnie heterotroficzne) reprezentujących trzynaście rodzajów. Ostatecznie uzyskano 30 sekwencji genu *tubA* oraz 39 *tubB*, obejmujących odpowiednio 78% i 86% obszarów kodujących. Dla ośmiu gatunków uzyskano więcej niż jedną sekwencję *tubA*, natomiast dla jedenastu gatunków więcej niż jedną sekwencję *tubB*. Różnice pomiędzy formami genów dla pojedynczych gatunków były niewielkie i znajdowały się w intronach lub w trzecich pozycjach kodonów. Aby zdefiniować dokładnie pozycje intronów oraz potwierdzić, że uzyskano sekwencje aktywnych genów porównywano je z odpowiednimi sekwencjami cDNA uzyskanymi w wyniku odwrotnej transkrypcji mRNA.

Uzyskane wyniki wykazały, że rozmieszczenie obu typów intronów jest odmienne – introny konwencjonalne występują w pozycjach konserwowanych, podczas gdy introny niekonwencjonalne w pozycjach unikalnych dla pojedynczych gatunków oraz grup blisko spokrewnionych taksonów. Co więcej, w grupie fotoautotroficznych gatunków zidentyfikowano jedenaście wydarzeń prowadzących do utraty intronu konwencjonalnego, natomiast w przypadku intronów niekonwencjonalnych piętnaście wydarzeń nabycia nowego intronu. Porównanie sekwencji wszystkich znanych intronów niekonwencjonalnych pozwoliło na wskazanie najbardziej konserwowanych elementów w ich sekwencji oraz w strukturze drugorzędowej RNA. Najmocniej konserwowane są nukleotydy w

pozycjach +4, +5 and +6 na początku intronu oraz w pozycjach -8, -7 i -6 na końcu (najczęściej na tych pozycjach występują nukleotydy CAG/CTG), które parują się ze sobą tworząc podstawę struktury drugorzędowej RNA. W efekcie koniec 3' jest przesunięty względem końca 5' o dwa nukleotydy. Dodatkowo wykazano, że na początku intronu oraz na początku eksonu za intronem występują najczęściej nukleotydy purynowe, natomiast na końcu eksonu przed intronem oraz na końcu intronu nukleotydy pirymidynowe. Bardzo często na pozycji trzeciej w eksonie za intronem występuje także nukleotyd C. Na podstawie uzyskanych wyników sformułowano dwie hipotezy. (1) Pierwsza z nich zakłada, że zmiana mutacyjna w obrębie sekwencji intronu może prowadzić do zmiany typu intronu, a tak zwane introny pośrednie mogłyby być formą przejściową pomiędzy typami. (2) Druga hipoteza dotyczy pochodzenia intronów niekonwencjonalnych – ze względu na ich podobieństwo do nieautonomicznych elementów transpozonowych MITE (ang. Miniature Inverted-repeats Transposable Elements) zasugerowano, że introny niekonwencjonalne mogą wywodzić się z podobnych do nich struktur.

Milanowski R., Gumińska N., Karnkowska A., Ishikawa T., Zakryś B. (2016). Intermediate introns in nuclear genes of euglenids – are they a distinct type? BMC Evol Biol 16:49.

Głównym celem badań przedstawionych w powyższej pracy była próba odpowiedzi na pytanie postawione w tytule: czy tak zwane introny pośrednie w genach jądrowych euglenin są rzeczywiście odrębnym typem intronów? Introny pośrednie tworzą stabilną strukturę drugorzędową zbliżającą końce intronu na poziomie RNA, a jedno lub oba złącza są zgodne z regułą GT/C-AG charakterystyczną dla spliceosomalnych intronów konwencjonalnych. Wcześniej sugerowano, że introny pośrednie mogą być formą przejściową pomiędzy intronami konwencjonalnymi i niekonwencjonalnymi (Russell i wsp. 2005) oraz że mogą być rozpoznawane przez dwa różne mechanizmy wycinania (Milanowski i wsp. 2014). W oparciu o wyniki analizy sekwencji intronów pośrednich oraz sposób ich rozmieszczenia w genach zaproponowano ich podział na dwie podgrupy: konwencjonalne/pośrednie i pośrednie/niekonwencjonalne. Do pierwszej z tych podgrup zaliczono introny o obu końcach typowych dla intronów spliceosomalnych, zdolne do tworzenia struktury drugorzędowej RNA zbliżającej końce intronu. Do drugiej podgrupy zaliczono introny z tylko jednym kanonicznym złączeniem (zazwyczaj na końcu 5') i stabilną strukturą drugorzędową RNA zgodną z konsensem opracowanym dla intronów niekonwencjonalnych (Milanowski i wsp. 2014). Na podstawie wcześniejszych analiz nie udało się jednoznacznie stwierdzić, czy cechy obserwowane u intronów pośrednich odzwierciedlają „pokrewieństwo” zarówno z intronami konwencjonalnymi jak i niekonwencjonalnymi, czy są też może efektem innych procesów. Aby rozwiązać ten problem postanowiono przeanalizować introny w genach *hsp90*, *tubB* i *gapC* (zawierające introny konwencjonalne, niekonwencjonalne jak i pośrednie) z sześciu szczepów *Euglena agilis*, wychodząc z założenia, że porównanie sekwencji homologicznych w obrębie pojedynczego gatunku pomoże wskazać cechy najbardziej konserwowane,

co z kolei mogłoby wskazać pochodzenie wybranych intronów. Gatunek *Euglena agilis* wydawał się być idealnym wyborem, ze względu na potwierdzoną wysoką zmienność genetyczną w jego obrębie.

Analiza sekwencji i struktury drugorzędowej RNA potwierdziła, że najbardziej konserwowanymi elementami intronów niekonwencjonalnych są parujące się ze sobą nukleotydy w pozycjach +4, +5 i +6/ -8, -7 i -6 (w większości przypadków na tych pozycjach występują nukleotydy CAG/CTG). Wykazano również, że obecność na początku intronów pośrednich/niekonwencjonalnych nukleotydów GT/C nie świadczy o ich „pokrewieństwie” z intronami konwencjonalnymi, ale jest efektem presji ewolucyjnej na zachowanie nukleotydu purynowego na końcu 5' (kolejny nukleotyd nie jest konserwowany). Wykazano także, że obecność struktury drugorzędowej w intronach konwencjonalnych/pośrednich również nie świadczy o „pokrewieństwie” z intronami niekonwencjonalnymi. Tym samym większość intronów pośrednich jest w rzeczywistości intronami konwencjonalnymi lub niekonwencjonalnymi. Nie odrzucono jednak możliwości, że istnieją prawdziwe introny pośrednie, usuwane potencjalnie przez dwa różne mechanizmy. W pracy pokazano także, że proces nabywania nowych intronów niekonwencjonalnych jest procesem ciągle trwającym i można go zaobserwować na poziomie pojedynczego gatunku (obecność unikalnego intronu w jednym z badanych szczepów). Sformułowano również hipotezę, że nabywanie nowych intronów niekonwencjonalnych może być związane z niehomologicznym łączeniem końców DNA (ang. non-homologous ends joining) działającym w trakcie naprawy podwójnych pęknięć (DSBR, ang. Double-Strand Break Repair). Pęknięcia takie powstają pod wpływem silnego promieniowania jonizującego, na które eugleniny są bardzo odporne.

Gumińska N., Płecha M., Zakryś B., [Milanowski R.](#) (2018). Order of removal of conventional and nonconventional introns from nuclear transcripts of *Euglena gracilis*. PLoS Genetics 14 (10): e1007761.

Według wcześniejszych badań proces usuwania intronów niekonwencjonalnych jest bardzo szybki i następuje wcześniej niż usunięcie outronu w procesie *trans*-splicingu konwencjonalnego (Tessier i wsp. 1995). Z kolei dołączenie splice-leadera wyprzedza proces usuwania z transkryptów konwencjonalnych intronów *cis* (Canaday i wsp. 2001). Jednak kolejność usuwania intronów nigdy nie była badana dla transkryptów zawierających oba typy intronów. Z tego powodu postanowiliśmy przeprowadzić taką analizę dla transkryptów dwóch genów, *tubA* i *gapC*. Porównywana była względna kolejność usuwania w obrębie par sąsiadujących ze sobą intronów. Co więcej, produkty pośrednie splicingu były analizowane za pomocą sekwencjonowania nowej generacji (technologia Pacific Bioscience SMRT system, PacBio), umożliwiającego odczyty długich sekwencji. Co ciekawe, uzyskane wyniki różniły się od wcześniejszych doniesień.

Wyniki porównania względnej kolejności usuwania intronów były zgodne dla wszystkich typów par intronów. Wykazano, że introny konwencjonalne w transkryptach genów *gapC* i *tubA* są usuwane szybciej niż introny niekonwencjonalne. Analiza produktów pośrednich splicingu, w której uwzględniono wiele tysięcy odczytów, potwierdziła tą obserwację. Jeżeli intron konwencjonalny był obecny w transkrypcie, introny niekonwencjonalne były również obecne. Z drugiej strony, jeżeli któryś z intronów niekonwencjonalnych był usunięty, introny konwencjonalne były nieobecne. Uzyskane wyniki były niezgodne z danymi literaturowymi wskazującymi, że introny niekonwencjonalne są usuwane szybciej niż konwencjonalne (Tessier i wsp. 1995). Z tego powodu postanowiliśmy powtórzyć eksperyment oryginalnie przeprowadzony przez Tessiera i wsp., w którym porównywano kolejność usuwania outronu i pierwszego intronu niekonwencjonalnego w genie *rbcS*. Uzyskane wyniki okazały się być inne niż donoszono wcześniej – wykazaliśmy, że trans-splicing może zachodzić przed splicingiem niekonwencjonalnym. Taki wynik był zgodny z efektami badań nad transkryptami genów *tubA* i *gapC*. W trakcie badań wykazaliśmy ponadto, że w przypadku intronów konwencjonalnych nie ma ściśle określonej kolejności usuwania intronów. Zasugerowaliśmy także, na podstawie niskiego poziomu produktów pośrednich splicingu niekonwencjonalnego, że proces ten nie tylko zaczyna się później niż splicing konwencjonalny, ale jest także bardzo szybki. Co więcej, bardzo wysoki poziom odczytów odpowiadających transkryptom z usuniętymi wszystkimi intronami konwencjonalnymi i zachowanymi intronami niekonwencjonalnymi wskazuje, że tego typu cząsteczki akumulują się w komórce do momentu rozpoczęcia się szybkiego procesu splicingu niekonwencjonalnego. To z kolei sugeruje istnienie niezidentyfikowanego czynnika, który opóźnia usuwanie intronów niekonwencjonalnych. Nie wykluczone, że czynnikiem tym jest inna lokalizacja obu typów splicingu.

## PODSUMOWANIE

### Wnioski:

Złącza intronów niekonwencjonalnych są zgodne z motywem konsensusowym  $Y|Rnn\underline{CAG} \cdots \underline{CUG}nnnnY|RnC$

Introny niekonwencjonalne wstawiane są bardzo często w nowych pozycjach (nowy typ mobilnych elementów genetycznych)

Większość tzw. intronów pośrednich to w rzeczywistości introny konwencjonalne lub niekonwencjonalne

Introny niekonwencjonalne są usuwane później niż konwencjonalne, aczkolwiek sam proces splicingu niekonwencjonalnego jest bardzo szybki

Kumulacja transkryptów z usuniętymi intronami konwencjonalnymi i z obecnymi niekonwencjonalnymi wskazuje na obecność niezidentyfikowane bariery pomiędzy splicingiem konwencjonalnym i niekonwencjonalnym (inna lokalizacja?)

#### Hipotezy:

Introny niekonwencjonalne mogą pochodzić od krótkich, nieautonomicznych transpozonów podobnych do elementów MITE (Miniature Inverted-repeat Transposable Elements)

Zasugerowano możliwość istnienia rzeczywistych intronów pośrednich posiadających sygnały umożliwiające ich usunięcie zarówno przez spliceosom jak i nieznanym mechanizmem niekonwencjonalnym

Możliwa jest zmiana typu intronu na skutek zmian mutacyjnych likwidujących sygnał rozpoznawany przez jeden z mechanizmów usuwania, a wprowadzających nowy sygnał

Nabywanie nowych intronów niekonwencjonalnych może być związane z działaniem mechanizmu niehomologicznego łączenia pękniętych końców DNA w procesie DSB (Double-Strand Breaks Repair)

## OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

### SEKWENCJONOWANIE GENOMÓW DWÓCH GATUNKÓW EUGLENIN (*E. HIEMALIS* I *E. LONGA*)

Gumińska N., Płecha M., Walkiewicz H., Hałakuc P., Zakryś B., Milanowski R. (2018). Culture purification and DNA extraction procedures suitable for next-generation sequencing of euglenids. *J Appl Phycol*, <https://doi.org/10.1007/s10811-018-1496-0>

Celem projektu realizowanego aktualnie przez mój zespół jest sekwencjonowanie genomów dwóch gatunków euglenin, *E. hiemalis* i *E. longa* (NCN Opus 2015/19/B/NZ8/00166). W obecnej chwili wiemy, że jądrowe genomy euglenin są nadspodziewanie duże, wysoce repetytywne i skomplikowane, przez co ich analiza jest trudna i czasochłonna (Ebenezer i wsp. 2017). Z tego powodu uzyskanie danych do złożenia sekwencji genomu o satysfakcjonującej jakości i wysokim pokryciu wymaga przygotowania próbek DNA bardzo dobrej jakości. Co więcej, szczepy komórek dostępne w kolekcjach kultur lub izolowane ze środowiska są zazwyczaj zanieczyszczone bakteriami i grzybami. Mechaniczny rozdział komórek z wykorzystaniem takich metod jak mikromanipulacja, czy też wirowanie, po których następuje pasażowanie w pożywkach płynnych, często nie umożliwia uzyskania kultur aksenicznych. Istotne jest więc odpowiednie przygotowanie próbek, które będą wolne od innych zanieczyszczeń biologicznych. Takie zanieczyszczenia, których ślady DNA pozostają w materiale przeznaczonym do

sekwencjonowania, mogą prowadzić do złych i zaskakujących wyników w trakcie procesu składania i analizowania genomów, zwłaszcza kiedy brak jest sekwencji referencyjnych. W przedstawionej powyżej pracy porównaliśmy pięć różnych metod izolacji DNA, aby wskazać najlepszą procedurę przygotowywania materiału genetycznego euglenin na potrzeby sekwencjonowania NGS. Przedstawiliśmy także metodę uzyskiwania i utrzymywania aksenicznych kultur euglenin. Za najlepszą i najwydajniejszą metodę izolacji DNA uznaliśmy zmodyfikowaną procedurę wykorzystującą CTAB. DNA wyizolowane i oczyszczone tą metodą charakteryzowało się najwyższą czystością i jakością wymaganą do przygotowania bibliotek do sekwencjonowania NGS. Genomowe DNA *E. hiemalis* i *E. longa* przygotowane wybraną metodą zostało skutecznie zsekwencjonowane z wykorzystaniem platformy HiSeq Illumina.

#### IDENTYFIKACJA MOLEKULARNA EUGLENIN

Łukomska-Kowalczyk M., Karnkowska A., Krupska M., Milanowski R., Zakryś B. (2016). DNA barcoding in autotrophic euglenids: evaluation of COI and 18S rDNA. *J Phycol* 52(6): 951-960.

Kulczycka A., Łukomska-Kowalczyk M., Zakryś M., Milanowski R. (2018). PCR identification of toxic euglenid species *Euglena sanguinea*. *J Appl Phycol* 30: 1759-1763.

Barkoding DNA opiera się na założeniu, że zróżnicowanie krótkich fragmentów DNA odzwierciedla zróżnicowanie organizmów. Metoda ta jest szybka i dokładna, nie wymaga także żywych okazów, czy też analiz morfologicznych. Stała się ona cennym narzędziem w badaniach nad bioróżnorodnością biologiczną, w rozpoznawaniu występowania taksonów w środowisku, w odkrywaniu nowych gatunków, a także w ekologii. Kluczowym warunkiem w barkodingu DNA jest dobór odpowiedniego markera, którego zróżnicowanie umożliwi rozpoznawanie taksonów wybranych rang. W przypadku mikroorganizmów eukariotycznych nie ma ustalonego jednego, uniwersalnego markera, uważa się jedynie, że zmienny region V4 w 18S rDNA można wykorzystywać jako pre-barkod do wstępnego szacowania. Dla poszczególnych grup zaproponowano różne, bardziej specyficzne markery. Fotoautotroficzne eugleniny są powszechnie występującą w środowisku słodkowodnym grupą mikroorganizmów eukariotycznych, jednak ich różnorodność i występowanie badane były jedynie w kilku miejscach na świecie i głównie na podstawie analiz morfologicznych. Z kolei wyniki badań metagenomicznych wskazują, że występowanie euglenin jest zazwyczaj niedoszacowane, co jest prawdopodobnie efektem ich odmiennych sekwencji 18S rDNA (słaba wydajność amplifikacji z wykorzystaniem starterów uniwersalnych dla eukariontów). Aby ominąć ten problem niezbędne jest opracowanie specyficznej dla tej grupy sekwencji barkodowej i metody jej amplifikacji. Zdecydowaliśmy się sprawdzić przydatność sekwencji COI oraz 18S rDNA jako potencjalnych sekwencji barkodowych. Analiza COI obejmująca 43 sekwencje reprezentujące 24 gatunki euglenin wykazała, że marker ten nie spełnia warunków wymaganych dla barkodu DNA, głównie z powodu braku uniwersalnych starterów umożliwiających jego skuteczną amplifikację. Analiza dla 18S rDNA

objęła zestaw 263 sekwencji ze zweryfikowanych taksonomicznie gatunków. Cała cząsteczka 18S rDNA jest zbyt długa, aby można jej było używać jako skutecznego markera, jednak jej fragmenty okazały się przydatne. Analiza trzech regionów zmiennych 18S rDNA wskazała, że jako barkod dla fototroficznych euglenin najlepiej sprawdzają się zmienne fragmenty V2V3 oraz V4, ze względu na ich wysoką efektywność identyfikacji (odpowiednio powyżej 95% i 90%) (Łukomska-Kowalczyk i wsp. 2016). Opisałiśmy także bazujący na metodzie zagnieżdżonego PCR prosty sposób identyfikacji pojedynczych komórek *Euglena sanguinea* oraz ich detekcji w próbkach wody. *Euglena sanguinea* jest jedynym gatunkiem eugleniny, który tworzy toksyczne zakwity będące przyczyną znaczących strat w rybnych stawach hodowlanych. Metoda ta może ułatwić monitoring zbiorników wodnych i szacowanie zagrożenia toksycznymi zakwitami (Kulczycka i wsp. 2018).

#### FILOGENEZA EUGLENIN

Milanowski R., Zakryś B., Kwiatowski J. (2001). Phylogenetic analysis of chloroplast small subunit rRNA genes of the genus *Euglena* Ehrenberg. *Int J Syst Evol Microbiol* 51: 783-791.

Milanowski R., Kosmala S., Zakryś B., Kwiatowski J. (2006). Phylogenetic analysis of photosynthetic euglenophytes based on combined chloroplast and cytoplasmic SSU rDNA sequences. *J Phycol* 42: 721-730.

Zakryś B., Milanowski R., Karnkowska A. (2017). Evolutionary origin of *Euglena*. In: Schwartzbach S., Shigeoka S. (eds) *Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology*. *Adv Exp Med Biol* 979: 3-17.

Badania nad eugleninami fototroficznymi rozpoczęły się w 1830 roku, kiedy to Ehrenberg opisał rodzaj *Euglena* włączając do niego cztery znane wcześniej gatunki (*Euglena viridis*, *E. sanguinea*, *E. acus*, *E. pleuronectes*) oraz dołączył dwa nowe, odkryte przez siebie (*E. pyrum* and *E. longicauda*). W trakcie swojej dalszej pracy Ehrenberg opisał wiele innych gatunków z rodzaju *Euglena*, a także ustanowił trzy nowe rodzaje: *Cryptoglena*, *Colacium* i *Trachelomonas*. Przez następnych 150 lat różnorodność euglenin poznawana była coraz dokładniej, czego efektem były opisy kolejnych taksonów opierające się na analizach morfologicznych. W efekcie liczba znanych gatunków wzrosła znacząco, opisano również nowe rodzaje (*Phacus*, *Lepocinclis*, *Eutreptia*, *Monomorphina*, *Eutreptiella*, *Strombomonas*). Jednak punktem zwrotnym, zmieniającym nasze spojrzenie na ewolucję i systematykę euglenin, było wprowadzenie analiz filogenetycznych w oparciu o dane molekularne. Początkowo używano jedynie sekwencji kodującej rRNA małej podjednostki rybosomu cytoplazmatycznego, znajdującej się w genomie jądrowym (nSSU rDNA, 18S rDNA), później do analiz włączano kolejne markery. Pierwsze analizy w oparciu o sekwencję kodującą rRNA małej podjednostki rybosomu chloroplastowego (cpSSU rDNA, 16S rDNA) zostały przeprowadzone przez mnie i moich współpracowników. Wyniki tych analiz (analiza samych sekwencji 16S rDNA oraz analiza połączonych sekwencji 16S i 18S rDNA) zostały opublikowane w dwóch pracach (Milanowski i wsp. 2001, Milanowski i wsp. 2006). Przeprowadzone

badania nie tylko pozwoliły na nowe spojrzenie na filogenezę fototroficznych euglenin, ale wskazały również na potrzebę licznych reklasyfikacji taksonomicznych w obrębie grupy. Co więcej, okazało się, że wiele cech morfologicznych (symplezjomorfie i cechy wynikające z konwergencji) nie powinny być rozpatrywane jako cechy diagnostyczne przy definiowaniu taksonów różnej rangi. Aktualny stan wiedzy na temat filogenezy i systematyki euglenin został przedstawiony w pierwszym rozdziale książki "Euglena: Biochemistry, Cell and Molecular Biology" (Zakryś i wsp. 2017).

#### WERYFIKACJE TAKSONOMICZNE NA PODSTAWIE DANYCH MORFOLOGICZNYCH I MOLEKULARNYCH

Zakryś B., Milanowski R., Empel J., Borsuk P., Gromadka R., Kwiatowski J. (2002). Two different species of *Euglena* - *E. geniculata* and *E. myxocylindracea* (Euglenophyceae) are virtually, genetically and morphologically identical. *J Phycol* 38: 1190-1199.

Zakryś B., Milanowski R., Kędzior M., Empel J., Borsuk P., Gromadka R., Kwiatowski J. (2004). Genetic variability of *Euglena agilis* (Euglenaceae). *Acta Soc Bot Pol* 73: 305-309.

Kosmala S., Karnkowska A., Milanowski R., Kwiatowski J., Zakryś B. (2005). The phylogenetic and taxonomic position of *Lepocinclis fusca* comb. nova (= *Euglena fusca*) (Euglenaceae). Morphological and molecular justification. *J Phycol* 41: 258-1267.

Kosmala S., Milanowski R., Brzóska K., Pękala M., Kwiatowski J., Zakryś B. (2007). Phylogeny and systematics of the genus *Monomorpha* (Euglenaceae) based on morphological and molecular data. *J Phycol* 43: 171-185.

Kosmala S., Bereza M., Milanowski R., Kwiatowski J., Zakryś B. (2007). Morphological and molecular examination of relationships and epitype establishment of *Phacus pleuronectes*, *Phacus orbicularis* and *Phacus hamelii*. *J Phycol* 43: 1071-1082.

Kosmala S., Karnkowska-Ischikawa A., Milanowski R., Kwiatowski J., Zakryś B. (2009). Phylogeny and Systematics of *Euglena* (Euglenaceae) species with axial, stellate chloroplasts based on morphological and molecular data - new taxa, emended diagnoses and epityfication. *J Phycol* 45: 464-481.

Karnkowska-Ischikawa A., Milanowski R., Kwiatowski J., Zakryś B. (2010). Taxonomy of the *Phacus oscilans* and its close relatives - balancing morphological and molecular features. *J Phycol* 46: 172-182.

Karnkowska-Ishikawa A., Milanowski R., Zakryś B. (2011). The species *Euglena deses* (euglenaceae) revisited: new morphological and molecular data. *J Phycol* 47: 653-61.

Karnkowska-Ishikawa A., Milanowski R., Triemer R.E., Zakryś B. (2012). Taxonomic revisions of morphologically similar species from two euglenoid genera: *Euglena* (*E. granulata* and *E. velata*) and *Euglenaria* (*Eu. anabaena*, *Eu. caudata*, *Eu. clavata*). *J Phycol* 48: 729-39.

Karnkowska-Ishikawa A., Milanowski R., Triemer R.E., Zakryś B. (2013). A redescription of morphologically similar species from the genus *Euglena*: *E. laciniata*, *E. sanguinea*, *E. sociabilis* and *E. splendens*. *J Phycol* 49: 616-26.

Zakryś B., Karnkowska-Ishikawa A., Łukomska-Kowalczyk M., Milanowski R. (2013). New photosynthetic euglenoid isolated in Poland: *Euglenaria clepsydroides* sp. nova (Euglenea). *Eur J Phycol* 48: 260-267.

Łukomska-Kowalczyk M., Karnkowska A., Milanowski R., Łach Ł., Zakryś B. (2015). Delimiting species in the *Phacus longicauda* complex (Euglenida) through morphological and molecular analyses. *J Phycol* 51: 1147-57.

Wprowadzenie metod filogenetyki molekularnej przyczyniło się do poszerzenia naszej wiedzy na temat stosunków pokrewieństwa w obrębie fototroficznycy euglenin. Opracowane na podstawie danych molekularnych drzewa filogenetyczne wykazały między innymi, że rodzaj *Euglena*, do którego przez wiele lat włączano gatunki niepasujące do innych rodzajów, jest w rzeczywistości para- lub nawet polifiletyczny. Było to poważną przesłanką do reklasyfikacji wielu znanych gatunków, a także podstawą wyodrębnienia nowych rodzajów dla grup taksonów tworzących zupełnie niezależne linie ewolucyjne. Co więcej, porównawcze badania morfologiczne i molekularne wykazały, że wyróżnianie wielu taksonów opisanych w literaturze nie jest taksonomicznie uprawnione. Powodem takiej sytuacji jest zmienność wielu cech morfologicznych, uznawanych za diagnostyczne, w zależności od warunków środowiska i hodowli lub od stadium ontogenezy. Z drugiej strony okazało się, że wiele nierozróżnialnych morfologicznie taksonów lokuje się na zupełnie odrębnych gałęziach drzew filogenetycznych. Te obserwacje stały się przyczynkiem do rozpoczęcia badań uwzględniających dane morfologiczne i molekularne, których celem była reorganizacja systematyki fototroficznycy euglenin. Efekty tych badań podsumowano poniżej.

- Wykazaliśmy, że liczba chloroplastów u *Euglena geniculata* i *E. myxocylindracea* (cecha, na podstawie której rozróżnia się te dwa gatunki) zależy od warunków hodowli i taksony te powinny być rozpatrywane jako jeden gatunek (Zakryś i wsp. 2002).
- Potwierdziliśmy bardzo wysoką zmienność genetyczną w obrębie gatunku *Euglena agilis* (Zakryś i wsp. 2004).
- Potwierdziliśmy, że dwa taksony, *Euglena spirogyra* i *Euglena fusca* powinny mieć rangę gatunków, odpowiednio *Lepocinclis spirogyroides* i *Lepocinclis fusca*; zdefiniowaliśmy dla nich nowe cechy diagnostyczne jak również wyznaczyliśmy epitypy (Kosmala i wsp. 2005).
- Zweryfikowaliśmy grupę *Monomorpha pyrum* w oparciu o dane morfologiczne i analizy sekwencji 18S rDNA. Ponieważ niewielkie różnicowanie morfologiczne obserwowane pomiędzy szczepami z tej grupy nie miało potwierdzenia w filogenezie, zakwalifikowaliśmy je jako jeden gatunek *M. pyrum*. Opisałiśmy także nowy gatunek *M. pseudopyrum* w oparciu jedynie o cechy molekularne. Wprowadziliśmy sprostowania do opisów diagnostycznych rodzajów

*Monomorphina* i *Cryptoglena* oraz gatunku *M. aenigmatica*, a także wyznaczyliśmy epityp dla *M. pyrum*, gatunku typowego w rodzaju *Monomorphina* (Kosmala i wsp. 2007).

- Dla trzech gatunków z rodzaju *Phacus* (*P. pleuronectes*, *P. orbicularis* i *P. hamelii*) zweryfikowaliśmy morfologiczne cechy diagnostyczne i wyznaczyliśmy epitypy w oparciu o dane literaturowe, analizę cech morfologicznych oraz cechy molekularne w 18S rDNA (Kosmala i wsp. 2007).
- Na podstawie badań morfologicznych i molekularnych, jak również w oparciu o dane literaturowe zweryfikowaliśmy grupę gatunków z rodzaju *Euglena* charakteryzujących się obecnością osiowych, gwiaździstych chloroplastów. Wyznaczyliśmy charakterystyczne sekwencje w 18S rDNA dla dziewięciu rozróżnialnych morfologicznie gatunków oraz zaktualizowaliśmy ich opisy. Dla siedmiu gatunków wyznaczone zostały epitypy (Kosmala i wsp. 2009).
- Wyznaczyliśmy epitypy i zaktualizowaliśmy opisy siedmiu gatunków z rodzaju *Phacus* (*P. oscillans*, *P. parvulus*, *P. pusillus*, *P. skujae*, *P. inflexus*, *P. polytrophos* i *P. smulkowskianus*) w oparciu o dane literaturowe, weryfikację cech diagnostycznych oraz cechy molekularne w obrębie 18S rDNA (Karnkowska-Ishikawa i wsp. 2010).
- Na podstawie analiz filogenetycznych dla 18S rDNA oraz analiz morfologicznych zweryfikowaliśmy grupę gatunków *Euglena deses* – liczba gatunków w grupie została ograniczona do trzech (*E. deses*, *E. satelles*, *E. adhaerens*). Zdefiniowaliśmy nowe cechy diagnostyczne dla *E. deses*, wyznaczyliśmy epityp i zaktualizowaliśmy opis (Karnkowska-Ishikawa i wsp. 2011).
- Dla trzech gatunków z rodzaju *Euglenaria* (*Eu. anabaena*, *Eu. caudata* i *Eu. clavata*) i dwóch gatunków z rodzaju *Euglena* (*E. granulata* i *E. velata*) wyznaczyliśmy epitypy i zaktualizowaliśmy opisy w oparciu o dane literaturowe, cechy morfologiczne jak również cechy molekularne w 18S rDNA (Karnkowska-Ishikawa i wsp. 2012).
- Na podstawie analiz filogenetycznych dla 18S rDNA oraz danych morfologicznych zweryfikowaliśmy taksony w obrębie grupy *Euglena sanguinea*. W efekcie liczba gatunków o cechach zbliżonych do obserwowanych u *E. sanguinea* została zredukowana z dwunastu do czterech. Wyznaczyliśmy także epitypy i zaktualizowaliśmy opisy diagnostyczne. Co więcej, analizy sekwencji 18S rDNA wykazały, że u *E. sanguinea* cząsteczki 18S rRNA są niezwykle długie – są to najdłuższe znane cząsteczki tego typu u eukariontów (Karnkowska-Ishikawa i wsp. 2013).
- Opisałiśmy nowy gatunek fototroficznej eugleniny *Euglenaria clepsydroides* (Zakryś i wsp. 2013).
- Izolując pojedyncze komórki z próbek środowiskowych i stosując metodę amplifikacji genomowej poddaliśmy analizie taksony w obrębie kompleksu *Phacus longicauda*. Na podstawie analiz morfologicznych i molekularnych udało się wyróżnić cztery gatunki, *P. longicauda*, *P. circumflexus*, *P. helikoides*, i *P. tortus*. Zmieniliśmy rangi taksonomiczne dwóch gatunków (*P. cordata* i *P. rotunda*) oraz opisaliśmy dwa nowe gatunki (*P. cristatus* i *P. crassus*). Dla wszystkich zweryfikowanych taksonów poprawiono opisy diagnostyczne i wyznaczono epitypy (Łukomska-Kowalczyk et al. 2015).

ZRÓŻNICOWANIE POPULACJI *ERPOBDELLA OCTOCULATA*

Koperski P., Milanowski R., Krzyk A. (2008). Morphological, ecological and genetic divergence in populations of *Erpobdella octoculata* (Hirudinea). *Lauterbornia* 65: 63-67.

Koperski P., Milanowski R., Krzyk A. (2011). Searching for cryptic species in *Erpobdella octoculata* (L.)(Hirudinea: Clitellata): discordance between the results of genetic analysis and cross-breeding experiments. *Contrib Zool* 80: 85-94.

Podstawowym celem badań było wykrycie bariery reprodukcyjnej i potencjalnej kryptycznej specjacji w obrębie bardzo powszechnie występującego i bardzo zmiennego morfologicznie gatunku pijawek *Erpobdella octoculata*. Różnice w osiąganym sukcesie reprodukcyjnym odmiennych form morfologicznych były szacowane eksperymentalnie. W badaniach uwzględniono również dane molekularne – zmienność w obrębie gatunku szacowano na podstawie sekwencji COI, ITS oraz metodą AP-PCR (Arbitrary Primers PCR). Wyniki analiz molekularnych wykazały, że brak jest bariery reprodukcyjnej pomiędzy różnymi formami morfologicznymi. Niewielkie różnice genetyczne pomiędzy osobnikami, szacowane za pomocą metody AP-PCR, związane były głównie z odległością geograficzną pomiędzy miejscami występowania poszczególnych subpopulacji. Na tej podstawie należy uznać, że *E. octoculata* jest jednym gatunkiem, pomimo ogromnej zmienności morfologicznej. Różny udział procentowy odmiennych form morfologicznych obserwowanych w próbkach środowiskowych wskazuje natomiast, że wartość adaptacyjna wzoru barwnego zależna jest od miejsca występowania. Obserwowane różnice mogą być efektem zależności pomiędzy śmiertelnością osobników o danym ubarwieniu ciała a barwą podłoża, na którym występują; czynnikiem regulacyjnym byłyby w takiej sytuacji ryby drapieżne.

Komosińska E., Wódkiewicz M., Jarzyna I., Jarochowska E., Milanowski R., Chwedorzewska K., Wyszomirski T. (2006). Some attempts to detect genetic differences between populations of small balsam (*Impatiens parviflora* DC.). *Biodiversity Research and Conservation*. 3-4: 245-247.

W powyższych badaniach podjęliśmy się próby wykrycia zróżnicowania genetycznego pomiędzy dwoma polskimi populacjami niecierpka drobnokwiatowego, jednorocznej rośliny bardzo inwazyjnej w Europie. W badaniach uwzględniono dwa typy analiz: morfologiczne (eksperyment „common garden”) oraz molekularne (metoda AFLP). Analiza AFLP nie wykazała różnic pomiędzy dwoma badanymi populacjami, jednak wyniki badań morfologicznych były dla niektórych parametrów odmienne, co może sugerować istnienie niewielkich różnic genetycznych. Różnice te okazały się być jednak zbyt małe, aby mogły zostać wykryte metodą AFLP. Niewykluczone też, że są one wynikiem efektu matczynego.

Bodył A., Mackiewicz P., Milanowski R. (2010). Did Trypanomatid parasites contain a eucaryotic alga-derived plastid in their evolutionary past? *J Parasitol* 96: 465-475.

Trypanosomatydy są grupą heterotroficznych wiciowców blisko spokrewnionych z eugleninami, które nabyły chloroplasty na drodze wtórnej endosymbiozy z jednokomórkową zielenicą. To odkrycie doprowadziło do sformułowania hipotezy zakładającej, że trypanosomatydy posiadały wtórny chloroplast w odległej, ewolucyjnej przeszłości. Ta hipoteza była krytykowana ze względu na brak ewidentnych dowodów wskazujących na fototroficzną przeszłość Trypanosomatydów – w ich genomach jądrowych nie wykryto żadnych genów pochodzenia roślinnego, plastydowego, czy sinicowego. Jednak wykrycie takich genów i jednoznaczne określenie ich pochodzenia jest zadaniem trudnym, a brak potwierdzonych przykładów nie świadczy jednoznacznie, że przodkowie Trypanosomatydów plastydów nigdy nie posiadali. Pasożytnicze Trypanosomatydy posiadają cztery dysmutazy nadtlenkowe (SOD) zależne od żelaza, a dwie z nich (SODA i SODC) trafiają do mitochondrium. Dysmutaza SODA posiada typową sekwencję sygnałową umożliwiającą jej transport do mitochondrium, tymczasem SODC posiada na N-końcu pre-sekwencję złożoną z dwóch części: z peptydu sygnałowego i położonego za nim peptydu tranzytowego. Co ciekawe, ta sekwencja liderowa posiada cechy charakterystyczne dla pre-sekwencji umożliwiających transport białka do otoczonych trzema błonami plastydów wtórnych euglenin i bruzdnic. Ta obserwacja może sugerować, że w odległej przeszłości Trypanosomatydy posiadały plastidy, aczkolwiek ich potencjalne pochodzenie nie jest jasne.

Zganiacz D., Milanowski R. (2017). Charakterystyka kolistych cząsteczek kwasów rybonukleinowych (circRNA). *Postępy Biochemii* 63(3): 221-232.

Powyższy artykuł jest pracą przeglądową, opisującą typy i mechanizmy powstawania kolistych cząsteczek RNA (circRNA), których występowanie jest dużo szersze, niż się wydawało jeszcze kilka lat temu. U wirusa HDV, wiroidów oraz wiroidopodobnych satelitarnych takie RNA pełni funkcję genomu. Koliste RNA zaobserwowano w związku z dojrzewaniem prekursorów rRNA i tRNA niektórych archeonów. Może występować jako produkt końcowy (introny) lub stadium przejściowe. U archeonów odnotowano również formy koliste kilku snoRNA oraz innych RNA pełniących funkcje regulacyjne. Zauważono powstawanie circRNA w związku z dojrzewaniem pre-mRNA zawierających introny spliceosomalne, introny grupy I oraz grupy II. Zaobserwowane cząsteczki składały się z sekwencji samych intronów, samych eksonów lub obu rodzajów na raz. Intronowe circRNA mogą być powiązane

z mobilnością tychże elementów genetycznych. Eksonowe (występują u eukariontów) często są tkankowo specyficzne lub charakterystyczne dla określonego etapu rozwoju organizmu; niektóre są zdolne do modulacji działania miRNA. Przypuszcza się też, że są powiązane z kilkoma chorobami neurodegeneracyjnymi.

## BIBLIOGRAFIA

Adl SM, Simpson AGB, Lane CE, et al. (25 co-authors). 2012. The revised classification of eukaryotes. *J Eukaryot Microbiol* 59:429–93.

Breckenridge DG, Watanabe Y-I, Greenwood SJ, Gray MW, Schnare MN. 1999. U1 small nuclear RNA and spliceosomal introns in *Euglena gracilis*. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:852–856.

Breglia SA, Slamovits CH, Leander BS. 2007. Phylogeny of phagotrophic euglenids (Euglenozoa) as inferred from hsp90 gene sequences. *J Eukaryot Microbiol* 54:86–92.

Breglia SA, Yubuki N, Hoppenrath M and Leander BS. 2010. Ultra structure and molecular phylogenetic position of a novel euglenozoan with extrusive episymbiotic bacteria: *Bihospitebacati* n.gen.etn.sp. (Symbiontida). *BMC Microbiol* 10:145.

Burki F. 2014. The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb Perspec Biol* 6:a016147.

Canaday J, Tessier LH, Imbault P, Paulus F. 2001. Analysis of *Euglena gracilis* alpha-, beta- and gamma-tubulin genes: introns and pre-mRNA maturation. *Mol Genet Genomics* 265:153–60.

Cavalier-Smith T. 1981. Eukaryote kingdoms: seven or nine? *Biosystems* 14:461-481.

Cavalier-Smith T. 2010. Kingdoms Protozoa and Chromista and the eozoan root of the eukaryotic tree. *Biol Lett* 6:342–345.

Cook JR, Roxby R. 1985. Physical properties of a plasmid-like DNA from *Euglena gracilis*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression* 824:80–83.

de Vargas C, Audic S, Henry N, Decelle J, Mahé F, Logares R, Lara E, Berney C, Le Bescot N, Probert J, et al. 2015. Eukaryotic plankton diversity in the sunlit ocean. *Science* 348: 1261605.

Dooijes D, Chaves I, Kieft R, Dirks-Mulder A, Martin W, Borst P. 2000. Base J originally found in kinetoplastida is also a minor constituent of nuclear DNA of *Euglena gracilis*. *Nucleic Acids Res* 28:3017–3021.

Ebel C, Frantz C, Paulus F, Imbault P. 1999. Trans-splicing and cis-splicing in the colourless Euglenoid, *Entosiphon sulcatum*. *Curr Genet* 35:542–550.

Ebenezer TE, Carrington M, Lebert M, Kelly S, and Field MC. 2017. *Euglena gracilis* Genome and Transcriptome: Organelles, Nuclear Genome Assembly Strategies and Initial Features. *Adv Exp Med Biol* 979:125–140.

Flegontova O, Flegontov P, Malviya S, Audic S, Wincker P, de Vargas C, Bowler C, Lukeš J, and Horák A. 2016. Extreme Diversity of Diplonemid Eukaryotes in the Ocean. *Curr Biol* 26:3060–3065.

Gawryluk RMR, del Campo J, Okamoto N, Strassert JFH, Lukeš J, Richards TA, Worden AZ, Santoro AE, and Keeling PJ. 2016. Morphological Identification and Single-Cell Genomics of Marine Diplonemids. *Curr Biol* 26:3053–3059.

Hampl V, Hug L, Leigh JW, Dacks JB, Lang BF, Simpson AGB, Roger AJ. 2009. Phylogenomic analyses support the monophyly of Excavata and resolve relationships among eukaryotic “supergroups”. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:3859–3864.

Henze K, Badr A, Wetterm M, Cerff R, Martin W. 1995. A nuclear gene of eubacterial origin in *Euglena gracilis* reflects cryptic endosymbioses during protist evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 92:9122–9126.

Hrdá Š, Fousek J, Szabová J, Hampl V, Vlček Č. 2012. The plastid genome of *Eutreptiella* provides a window into the process of secondary endosymbiosis of plastid in euglenids. *PLoS One* 7:e33746.

Milanowski R, Karnkowska A, Ishikawa T and Zakryś B. 2014. Distribution of conventional and nonconventional introns in tubulin ( $\alpha$  and  $\beta$ ) genes of euglenids. *Mol Biol Evol* 31:585-593.

Muchhal US, Schwartzbach SD. 1994. Characterization of the unique intron - exon junctions of *Euglena* gene(s) encoding the polyprotein precursor to the light-harvesting chlorophyll a/b binding protein of photosystem II. *Nucleic Acids Res* 22:5737–5744.

Ravel-Chapuis P. 1988. Nuclear rDNA in *Euglena gracilis*: paucity of chromosomal units and replication of extrachromosomal units. *Nucleic Acids Res* 16:4801–4810.

Russell AG, Watanabe Y, Charette JM, Gray MW. 2005. Unusual features of fibrillarin cDNA and gene structure in *Euglena gracilis*: evolutionary conservation of core proteins and structural predictions for methylation-guide box C/D snoRNPs throughout the domain Eucarya. *Nucleic Acids Res* 33:2781–2791.

Schnare MN, Gray MW. 1990. Sixteen discrete RNA components in the cytoplasmic ribosome of *Euglena gracilis*. *J Mol Biol* 215:73–83.

Tessier LH, Paulus F, Keller M, Vial C, Imbault P. 1995. Structure and expression of *Euglena gracilis* nuclear *rbcS* genes encoding the small subunits of the ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase: A novel splicing process for unusual intervening sequences? *J Mol Biol* 245:22–33.

Turmel M, Gagnon M-C, O’Kelly CJ, Otis C, Lemieux C. 2009. The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol Biol Evol* 26:631–648.

Yabuki A, Nakayama T, Yubuki N, Hashimoto T, Ishida K-I and Inagaki Y. 2011. *Tsukubamonas globosa* n. gen., n. sp., a novel excavate flagellate possibly holding a key for the early evolution in “Discoba”. *J Eukaryot Microbiol* 58: 319–331.

11.12.2018 r.

Rafał Milanowski