

Dr Andrzej Bodył

Autoreferat

Pracownia Protistologii Ewolucyjnej
Zakład Biologii, Ewolucji i Ochrony Bezkręgowców
Instytut Biologii Środowiskowej
Uniwersytet Wrocławski



Wrocław 2019

Spis treści

1. IMIĘ I NAZWISKO	5
2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE	5
3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH	5
4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (DZ. U. 2017 R. POZ. 1789)	6
a) Tytuł osiągnięcia naukowego	6
b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego	6
c) Omówienie celu naukowego/artystycznego ww. pracy/prac i osiągniętych wyników wraz z omówieniem ich ewentualnego wykorzystania	8
Wstęp	8
Ewolucja systemu importu białek do plastydów pierwotnych oraz organellowa natura chromatoforów <i>Paulinella chromatophora</i>	11
Czy białka były początkowo kierowane do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych?	11
Chromatofory <i>Paulinella chromatophora</i> jako organelle komórkowe	14
Ewolucja plastydów chromalweolatowych i kierowanie ich białek kodowanych przez genom jądrowy do innych kompartmentów niż plastyd	18
Krytyka hipotezy Chromalveolata	18
Nowy model ewolucji plastydów chromalweolatowych	24
Kierowanie dysmutazy nadtlenkowej zawierającej żelazo do trzech różnych kompartmentów u bruzdnicy <i>Lingulodinium polyedrum</i>	27
Utrata plastydów u trypanosomatidów i dalsze losy ich białek kodowanych przez genom jądrowy	30
Podsumowanie	34
5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH	35
Publikacje przed doktoratem	35
Transport aktywny przez plazmalemę komórek roślinnych	35
Dziedziczenie cech nabytych	35
Pochodzenie ewolucyjne nefotosyntetycznej eugleniny <i>Euglena</i> (wcześniej <i>Astasia</i>) <i>longa</i>	36
Publikacje po doktoracie	37
Teoria endosymbiotyczna	37
Transfery horyzontalne plastydów chromalweolatowych	37
Teoria kompartmentacji Schnepfa a pochodzenie plastydów trójbłonowych bruzdnic i euglenidów	38

Białka kierowane do plastydów roślin wyższych przez system błon wewnętrznych	39
Sygnały kierujące białka do chromatoforów <i>Paulinella chromatophora</i> oraz implikacje endosymbiozy chromatoforowej dla ewolucji fotosyntetycznych organelli komórkowych.....	40
„Niezwykłe” plastydy pochodzenia trzeciorzędowego u bruzdnic	42
Transfer genów do osobliwego genomu „minikółkowego” plastydu peridininowego.....	43
Niefotosyntetyczny plastyd występujący u przedstawicieli Apicomplexa	44
Transport białek przez błonę periplastydową w plastydach czterobłonowych pochodzenia krasnorostowego.....	45
Import białek do plastydów chlorarachniofitów a ewolucja plastydów czterobłonowych przez podstawienie plastydów	46
Genomy nukleomorfowe	47
Genomy protistów.....	48
Ewolucja komórek roślinnych	48
6. BIBLIOGRAFIA.....	49

1. IMIĘ I NAZWISKO

Andrzej Bodył

2. POSIADANE DYPLOMY, STOPNIE NAUKOWE/ARTYSTYCZNE – Z PODANIEM NAZWY, MIEJSCA I ROKU ICH UZYSKANIA ORAZ TYTUŁU ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

1997

Uzyskanie stopnia doktora nauk biologicznych w dziedzinie biologii, Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski (obecnie: Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski)

Tytuł pracy

Analiza procesów nabywania organelli komórkowych na przykładzie złożonych plastydów Chromista i Chlorarachniophyta

Promotor

Prof. dr hab. Lech Borowiec

1991

Uzyskanie tytułu magistra biologii (ze specjalizacją biologii środowiskowej), Wydział Nauk Przyrodniczych, Uniwersytet Wrocławski (obecnie: Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski)

Tytuł pracy

*Wpływ wybranych inhibitorów metabolicznych na pobieranie NH_4^+ przez siewki *Pisum arvense* L.*

Promotor

Prof. dr hab. Józef Buczek

3. INFORMACJE O DOTYCHCZASOWYM ZATRUDNIENIU W JEDNOSTKACH NAUKOWYCH/ARTYSTYCZNYCH

Od 2011: adiunkt, Zakład Biologii, Ewolucji i Ochrony Bezkręgowców, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

2006–2011: adiunkt, Zakład Bioróżnorodności i Taksonomii Ewolucyjnej, Wydział Nauk Biologicznych, Uniwersytet Wrocławski

2003–2006: adiunkt, Zakład Bioróżnorodności i Taksonomii Ewolucyjnej, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego

1998–2003: adiunkt, Zakład Systematyki Zwierząt i Zoogeografii, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego

1991–1998: asystent, Zakład Systematyki Zwierząt i Zoogeografii, Wydział Nauk Przyrodniczych Uniwersytetu Wrocławskiego

4. WSKAZANIE OSIĄGNIĘCIA WYNIKAJĄCEGO Z ART. 16 UST. 2 USTAWY Z DNIA 14 MARCA 2003 R. O STOPNIACH NAUKOWYCH I TYTULE NAUKOWYM ORAZ O STOPNIACH I TYTULE W ZAKRESIE SZTUKI (Dz. U. 2017 R. POZ. 1789)

a) Tytuł osiągnięcia naukowego

Ewolucja plastydów a drogi importu białek u jednokomórkowych organizmów eukariotycznych

b) Spis publikacji wchodzących w skład osiągnięcia habilitacyjnego

1. **Bodył A.**, Mackiewicz P., Stiller J.W. (2007) *The intracellular cyanobacteria of Paulinella chromatophora: endosymbionts or organelles?* **Trends in Microbiology** 15: 295–296.

[IF₂₀₀₇: **7.618**; IF-5₂₀₀₇: **7.248**; MNiSW₂₀₁₆: **45**]

2. **Bodył A.**, Mackiewicz P., Stiller J.W. (2010) *Comparative genomic studies suggest that the cyanobacterial endosymbionts of the amoeba Paulinella chromatophora possess an import apparatus for nuclear-encoded proteins.* **Plant Biology** 12: 639–649.

[IF₂₀₁₀: **2.409**; IF-5₂₀₁₀: **2.579**; MNiSW₂₀₁₆: **35**]

3. **Bodył A.**, Mackiewicz P., Stiller J.W. (2009) *Early steps in plastid evolution: current ideas and controversies.* **BioEssays** 31: 1219–1232.

[IF₂₀₀₉: **5.125**; IF-5₂₀₀₉: **5.353**; MNiSW₂₀₁₆: **40**]

4. **Bodył A.** (2005) *Do plastid-related characters support the chromalveolate hypothesis?* **Journal of Phycology** 41: 712–719.

[IF₂₀₀₅: **2.502**; IF-5₂₀₀₅: **brak**; MNiSW₂₀₁₆: **35**]

5. **Bodył A.**, Moszczyński K. (2006) *Did the peridinin plastid evolve through tertiary endosymbiosis? A hypothesis.* **European Journal of Phycology** 41: 435–448.

[IF₂₀₀₆: **1.293**; IF-5₂₀₀₆: **brak**; MNiSW₂₀₁₆: **30**]

6. **Bodył A.** (2018) *Did some red alga-derived plastids evolve via kleptoplastidy? A hypothesis.* **Biological Reviews** 93: 201–222.

[IF₂₀₁₈: **11.700**; IF-5₂₀₁₈: **11.996**; MNiSW₂₀₁₆: **50**]

7. **Bodył A.**, Mackiewicz P. (2007) *Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments.* **Archives of Microbiology** 187: 281–296.

[IF₂₀₀₇: **1.838**; IF-5₂₀₀₇: **2.193**; MNiSW₂₀₁₆: **20**]

8. **Bodył A.**, Mackiewicz P. (2008) *Were class C iron-containing superoxide dismutases of trypanosomatid parasites initially imported into a complex plastid? A hypothesis based on analyses of their N-terminal targeting signals.* **Parasitology** 135: 1101–1110.

[IF₂₀₀₈: **2.071**; IF-5₂₀₀₈: **2.306**; MNiSW₂₀₁₆: **30**]

9. **Bodył A.**, Mackiewicz P., Milanowski R. (2010) *Did trypanosomatid parasites contain a eukaryotic alga-derived plastid in their evolutionary past?* **Journal of Parasitology** 96: 465–475.

[IF₂₀₁₀: **1.208**; IF-5₂₀₁₀: **1.365**; MNiSW₂₀₁₆: **20**]

Dane scjentometryczne dla osiągnięcia habilitacyjnego

h-Index wg Web of Science: **7**

h-Index wg Scopus: **8**

Sumaryczny IF: **35,763**

Liczba cytowań wg Web of Science: **203**

Liczba cytowań wg Scopus: **230**

Suma punktów MNiSW: 305

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

WSTĘP

Komórka eukariotyczna jest złożoną komórką, która posiada różne kompartmenty znane jako organelle komórkowe. Niektóre z tych organelli (np. jądro komórkowe i aparat Golgiego) wyewoluowały endogennie (tj. niesymbiotycznie), podczas gdy inne, takie jak mitochondria i plastydy, powstały egzogennie, czyli na drodze endosymbiozy (Bodył i in. 2017). W przeciwieństwie do mitochondriów, które są potomkami jednej endosymbiozy (Roger i in. 2017b), ewolucja plastydów jest znacznie bardziej złożona i ciągle niejasna, stanowiąc prawdziwy „gorący temat” we współczesnej biologii ewolucyjnej.

Istnieją trzy podstawowe typy plastydów: plastydy pierwotne, plastydy wtórne oraz plastydy trzeciorzędowe (Archibald 2009). Plastydy pierwotne wyewoluowały z sinicy (=cyjanobakterii) i są otoczone przez dwie błony. Przyjmuje się, że obie błony pochodzą od sinicy, która – jako bakteria gram-ujemna – była otoczona nie tylko przez plazmalemę, ale również błonę zewnętrzną (Cavalier-Smith 2000). Plastydy pierwotne występują u glaukofitów, krasnorostów oraz roślin zielonych obejmujących zielenice i rośliny lądowe. Brakujące ogniwo w ewolucji tych plastydów stanowią glaukofity, u których zachowała się jeszcze bakteryjna ściana komórkowa (znana jako peptydoglikan) pomiędzy błonami otoczkowymi ich plastydów (Jackson i in. 2015).

Plastydy wtórne powstały z glonów zawierających plastydy pierwotne, takich jak krasnorosty i zielenice. Są one otoczone przez trzy lub cztery błony. W przypadku plastydów czterobłonowych zakłada się, że ich dwie najbardziej wewnętrzne błony (nazywane otoczką plastydową) wywodzą się z plastydu endosymbionta, błona trzecia (nazywana błoną periplastydową) – z plazmalemmy endosymbionta, a błona najbardziej zewnętrzna – z błony fagosomalnej gospodarza (Agrawal i Striepen 2010). W przypadku plastydów trójbłonowych przyjmuje się, że ich dwie najbardziej wewnętrzne błony odpowiadają otoczce plastydowej, podczas gdy najbardziej zewnętrzna błona – błonie fagosomalnej (Agrawal i Striepen 2010).

Plastydy wtórne pochodzenia krasnorostowego wykryto u następujących grup protistów: bruzdnic (=dinoflagellaty), perkinsidów, apikompleksów, chromeridów, kryptofitów, heterokontów (=stramenopile) oraz haptofitów. Wśród licznych plastydów pochodzenia

krasnorostowego, trzy błony otoczkowe posiadają tylko plastydy bruzdnic, natomiast wszystkie pozostałe plastydy tego typu posiadają cztery błony otoczkowe. Typowy plastyd bruzdnicowy, znany jako plastyd peridininowy, wyróżnia się obecnością karotenoidu peridiny. Pasożytniczy przedstawiciele gromady Apicomplexa (np. *Plasmodium falciparum* i *Toxoplasma gondii*) ciągle utrzymują nefotosyntetyczny plastyd, nazywany apikoplastem, który pełni ważne funkcje metaboliczne, takie jak biosynteza hemu, kwasów tłuszczowych i izoprenoidów (Chakraborty 2016).

Plastydy wtórne pochodzenia zielenicowego występują u euglenidów, chlorarachniofitów oraz bruzdnic z rodzaju *Lepidodinium*. Plastydy euglenidów otoczone są przez trzy błony, podczas gdy plastydy chlorarachniofitów i *Lepidodinium* – przez cztery.

Brakujące ogniwo w ewolucji plastydów wtórnych reprezentują kryptofity i chlorarachniofity. U glonów tych, pomiędzy otoczką plastydową a błoną periplastydową, zachowała się cytoplazma endosymbionta (w postaci tzw. kompartmentu periplastydowego) oraz jego jądro (w postaci tzw. nukleomorfu) (Moore i Archibald 2009).

Plastydy trzeciorzędowe powstały z glonów zawierających plastydy wtórne (np. haptofitów). Otoczone są one przez trzy błony. Tak jak w przypadku plastydów wtórnych bruzdnic i euglenidów, przyjmuje się, że ich dwie najbardziej wewnętrzne błony odpowiadają otoczce plastydowej, a najbardziej zewnętrzna błona – błonie fagosomalnej (Gagat i in. 2014). Plastydy trzeciorzędowe znaleziono u bruzdnic z rodzajów *Karenia* i *Karlodinium*. W plastydach tych występuje karotenoid fukoksantyna, dlatego też nazywane są one plastydami fukoksantynowymi.

Cavalier-Smith i Lee opublikowali w 1985 r. krótką, ale bardzo wpływową pracę, która zawierała kilka nowych hipotez o ewolucji organelli komórkowych pochodzenia endosymbiotycznego, takich jak mitochondria i plastydy. Hipotezy te bardzo szybko stały się paradygmatami, które do dziś kształtują myślenie o ewolucji plastydów. Jeden z tych paradygmatów dotyczy różnic pomiędzy endosymbiontami a organellami. Według Cavaliera-Smitha i Lee (1985) endosymbionty kodują wszystkie swoje geny, natomiast organelle kodują tylko część swoich pierwotnych genów. Pozostałe geny organellowe występują w genomie jądrowym i ich produkty białkowe importowane są do właściwego organellum przy pomocy specyficznych sekwencji kierujących oraz charakterystycznych systemów transportujących (=translokony), które występują w jego błonach otoczkowych. Tym samym, kolejną charakterystyczną cechą mitochondriów i plastydów byłoby posiadanie systemu importu białek.

Kolejny paradygmat zaproponowany przez Cavaliera-Smitha i Lee (1985) dotyczy etapów w ewolucji organelli komórkowych pochodzenia endosymbiotycznego. Autorzy ci

wyróżnili dwa główne etapy w tym procesie. W pierwszym etapie pochłonięte na drodze fagocytozy komórki prokariotów lub eukariotów umieszczane są w fagosomach (=wodniczkach pokarmowych), gdzie zwykle zachodzi ich trawienie. Dlatego ustanowienie stałego endosymbionta wymaga zaburzenia w procesie trawienia (rodzaj „niestrawności”). [Cavalier-Smith i Lee \(1985\)](#) zasugerowali, że do takiego zaburzenia może dojść w następstwie albo pęknięcia błony fagosomalnej, albo inaktywacji receptorów dla lizosomów na błonie fagosomalnej. W drugim etapie ewolucji organelli endosymbiotycznych stałe endosymbionty ulegają transformacji w organelle. Według [Cavaliera-Smitha i Lee \(1985\)](#) transformacja ta składa się z dwóch głównych procesów: (1) masowego transferu genów z genomu (lub genomów) endosymbionta do genomu jądrowego gospodarza oraz (2) powstania w błonach otoczkowych organellum translokonów dla białek kodowanych przez przetransferowane geny.

[Cavalier-Smith i Lee \(1985\)](#) założyli istnienie bardzo poważnych trudności w transformacji endosymbionta w organellum, które wynikają z powstania systemu importu białek. Każda błona otaczająca mitochondria i plastydy posiada swój własny translokon rozpoznający specyficzne sekwencje kierujące w importowanych białkach. Na przykład w plastydach pierwotnych wyewoluowały dwa translokony: translokon Toc w zewnętrznej błonie plastydowej oraz translokon Tic w wewnętrznej błonie plastydowej ([Shi i Theg 2013](#)). Każdy z tych translokonów rozpoznaje N-końcową sekwencję kierującą znaną jako peptyd tranzytowy. Według [Cavaliera-Smitha i Lee \(1985\)](#) ewolucja translokonów, razem z ich sekwencjami kierującymi, stanowi krytyczny etap w ewolucji organelli pochodzenia endosymbiotycznego, którego przekroczenie wydaje się prawie niemożliwe. Pogląd ten był rozwijany przez [Cavaliera-Smitha](#) w jego następnych pracach ([Cavalier-Smith 1992, 1999](#)) i stał się kolejnym paradygmatem w badaniach nad ewolucją plastydów.

Paradygmat, że transformacja endosymbionta w organellum napotyka na bardzo poważne trudności doprowadził do ustanowienia zasady minimalizacji zdarzeń endosymbiotycznych. W oparciu o tę zasadę zaproponowano szereg hipotez, z których większość okazała się kontrowersyjna. Na przykład [Cavalier-Smith](#) zasugerował w 1999 r. hipotezę Cabozoa, zgodnie z którą plastydy euglenidów i chlorarachniofitów wyewoluowały ze wspólnego przodka zielenicowego. Jeszcze bardziej kontrowersyjna niż hipoteza cabozoanowa była hipoteza wspólnego pochodzenia plastydów kryptofitowych i chlorarachniofitowych, czyli plastydów zawierających nukleomorfy ([Cavalier-Smith 1992](#)). Jednak późniejsze analizy filogenetyczne genów plastydowych, nukleomorfowych i jądrowych doprowadziły do odrzucenia obu tych hipotez ([Rogers i in. 2007, Curtis i in. 2012](#)).

Głównym celem moich badań było zrozumienie mechanizmów ewolucji różnych typów plastydów oraz ich białek kodowanych przez genomy jądrowe. Jak wspomniano wcześniej, myślenie w obszarze ewolucji plastydów jest ciągle zdominowane przez hipotezy zawarte we wpływowej pracy [Cavaliera-Smitha i Lee \(1985\)](#). Jednak praca ta ukazała się ponad 30 lat temu, kiedy nasza wiedza o strukturze, biologii i ewolucji komórek eukariotycznych – ze szczególnym uwzględnieniem komórek protistów – była bardzo ograniczona. Dlatego w moich badaniach poddałem krytycznej analizie akceptowane obecnie hipotezy, teorie i paradygmaty. Ponadto zaproponowałem nowe hipotezy, które znacznie lepiej wyjaśniałyby dostępne obecnie dane.

Celem moich badań było uzyskanie odpowiedzi na następujące kluczowe pytania: (1) jak często dokonują się transformacje fotosyntetycznych endosymbiontów w organelle? (2) czy transport ko-translacyjny był ancestralnym mechanizmem importu białek do plastydów pierwotnych? (3) czy chromatofory *Paulinella chromatofora* osiągnęły już status organelli komórkowych? (4) czy ewolucja plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego przebiegała zgodnie z hipotezą Chromalveolata? (5) czy białka plastydowe ze złożonymi presekwencjami kierowane są do innych organelli niż plastyd eukariotyczny? (6) czy trypanosomy i leishmanie posiadały w swojej przeszłości ewolucyjnej plastyd? oraz (7) jakie są dalsze losy białek plastydowych kodowanych przez genom jądrowy po utracie plastydu?

Moje podejście koncepcyjno-teoretyczne do ewolucji plastydów i ich białek kodowanych przez genomy jądrowe, które zostało uzupełnione przez analizy bioinformatyczne, miało jedno zasadnicze źródło inspiracji. Źródłem tym było popperowskie spojrzenie na naukę, w którym najbardziej istotne jest tworzenie nowych hipotez.

Moje badania mogą znaleźć w przyszłości praktyczne zastosowania. Jednym z tych zastosowań byłoby konstruowanie organizmów chimerycznych składających się z różnych typów zarówno plastydów, jak i gospodarzy.

EWOLUCJA SYSTEMU IMPORTU BIAŁEK DO PLASTYDÓW PIERWOTNYCH ORAZ ORGANELLOWA NATURA CHROMATOFORÓW *PAULINELLA CHROMATOPHORA*

Czy białka były początkowo kierowane do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych?

Publikacja:

Bodył A., Mackiewicz P., Stiller J.W. (2009) *Early steps in plastid evolution: current ideas and controversies*. **BioEssays** 31: 1219–1232.

Cele badań:

- krytyczna analiza założeń, na których oparta jest hipoteza o wczesnym imporcie białek do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych;
- nowe interpretacje danych, które przytaczane są na poparcie hipotezy „wczesnego transportu wewnątrz błonowego”;
- analiza bioinformatyczna presekwencji w transporterach występujących w wewnętrznej błonie plastydowej;
- sformułowanie hipotezy tłumaczącej utratę błony fagosomalnej przez ancestralny plastyd pierwotny;
- przedstawienie nowego modelu ewolucji systemu importu białek do plastydów pierwotnych.

Jak wspomniano wcześniej, system importu białek do plastydów pierwotnych tworzą dwa główne translokony: translokon Toc w ich błonie zewnętrznej oraz translokon Tic w ich błonie wewnętrznej (Shi i Theg 2013). Translokon Toc składa się z kilku białek, takich jak Toc12, Toc34, Toc75 oraz Toc159. Jego centralna część zawiera białka Toc34, Toc75 i Toc159. Białko Toc75 buduje kanał transportujący białka, natomiast białka Toc34 i Toc159 funkcjonują jako receptory dla importowanych białek. Białko Toc64 jest również białkiem receptorowym, ale jest ono luźno związane z centralną częścią translokonu Toc. Toc12 występuje w przestrzeni międzybłonowej.

Translokon Tic tworzą następujące białka: Tic20, Tic21, Tic22, Tic32, Tic40, Tic55, Tic62 oraz Tic110. Białka Tic20 i Tic21 budują kanały transportujące białka, natomiast białko Tic22 występuje w przestrzeni międzybłonowej. Białka Tic32, Tic55 oraz Tic62 tworzą kompleks wrażliwy na stan redoks wewnętrznej błony plastydowej, co umożliwia regulację transportu białek przez tę błonę. Funkcja białka Tic110 nie jest jasna. Niektórzy badacze dowodzą, że białko to buduje kanał transportujący białka, natomiast inni, że pełni ono funkcję „rusztowania” dla pozostałych białek Tic. Białko Tic40 działa jako ko-chaperon.

Białka importowane są do plastydów pierwotnych post-translacyjnie. Są one najpierw syntetyzowane w cytozolu, następnie kierowane do otoczki plastydowej i ostatecznie transportowane przez jej dwie błony do stromy. Ważną rolę w całym tym procesie spełnia N-końcowy peptyd tranzytowy.

Chociaż zdecydowana większość białek importowanych do plastydów pierwotnych używa szlaku post-translacyjnego, to jednak niektóre z nich, takie jak α -amylaza oraz anhydraza α -węglanowa, transportowane są ko-translacyjnie. Białka te noszą N-końcowe peptydy sygnałowe i kierowane są do plastydów przez retikulum endoplazmatyczne (ER) oraz aparat Golgiego.

Biorąc pod uwagę ten mechanizm transportu, [Bhattacharya i in.](#) zaproponowali w [2007 r.](#) hipotezę, zgodnie z którą białka były początkowo importowane do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych i posiadały peptydy sygnałowe jako ich sekwencje kierujące. Na poparcie swojej hipotezy, nazwanej przeze mnie hipotezą „wczesnego transportu wewnątrzłonowego,” autorzy ci przedstawili kilka dodatkowych argumentów. Na przykład translokony Toc i Tic mają złożoną strukturę i nie mogły służyć jako systemy transportujące we wczesnej ewolucji plastydów pierwotnych. Ponadto analizy filogenetyczne transporterów dla trioz i heksoz – które występują w wewnętrznej błonie plastydowej – wykazały, że grupują się one z transporterami charakterystycznymi dla ER i aparatu Golgiego.

W pracy z [BioEssays \(2009\)](#), która ukazała się w dziale Problems and Paradigms, przedstawiłem szereg argumentów przeciw hipotezie „wczesnego transportu wewnątrzłonowego”. Poniżej podaję niektóre z nich.

Po pierwsze, białko Toc75 posiada nie tylko domenę kanałową, ale również domenę receptorową i samo jest zdolne do transportowania białek przez zewnętrzną błonę plastydową. Dlatego łatwo sobie wyobrazić gradualistyczną ewolucję translokonów Toc i Tic. Pierwszym etapem w takiej ewolucji byłaby insercja białka Toc75 we właściwej topologii, a w następnych etapach byłyby włączane lub adaptowane kolejne białka Toc i Tic. Gradualistyczna ewolucja translokonów Toc i Tic jest bardzo dobrze widoczna także w przypadku pojedynczych białek, np. białka Toc159. Po drugie, pierwsze analizy proteomu plastydowego *Arabidopsis thaliana* sugerowały, że aż 8% jego białek wyposażonych jest w peptydy sygnałowe. Jednak późniejsze badania poddały w wątpliwość te wyliczenia. Dlatego zaproponowałem hipotezę, że transport przez system błon wewnętrznych wyewoluował dla specyficznej grupy białek plastydowych u roślin wyższych, które wymagają glikozylacji w aparacie Golgiego lub kierowane są do dwóch różnych kompartmentów (np. plastydu i wakuoli). Po trzecie, analizy bioinformatyczne transporterów dla trioz i heksoz, które przeprowadził dr hab. Paweł Mackiewicz, wykazały, że noszą one typowe plastydowe peptydy tranzytowe. Tym samym jest mało prawdopodobne, aby białka te były kiedykolwiek transportowane przez system błon wewnętrznych. Poza tym taki szlak importu prowadziłby do ich błędnego kierowania do ER lub aparatu Golgiego. Po czwarte,

import białek do wszystkich plastydów, które wyewoluowały z glonów eukariotycznych zachodzi przez system błon wewnętrznych, co stało się dla [Bhattacharya i in. \(2007\)](#) inspiracją do zaproponowania hipotezy „wczesnego transportu wewnątrzblonowego”. Jednak w żadnym plastydzie eukariotycznym nie doszło do transformacji jego ancestralnego ko-translacyjnego mechanizmu importu w mechanizm post-translacyjny, tak jak postulują to ci autorzy dla plastydów pierwotnych. Transformacja taka byłaby prawdopodobnie letalna dla komórki gospodarza.

W pracy z [BioEssays \(2009\)](#) zaproponowałem również nowy model ewolucji systemu import białek do plastydów pierwotnych. Zakłada się, że sinicowy przodek plastydów pierwotnych został pochłonięty na drodze fagocytozy. Dlatego byłby on początkowo otoczony przez trzy błony: dwie błony sinicy (jej plazmalemę i błonę zewnętrzną) oraz błonę fagosomalną gospodarza. Jednak współczesne plastydy pierwotne posiadają tylko dwie błony otoczkowe, co oznacza, że jedna z ich pierwotnych błon musiała zostać utracona. Sformułowalem hipotezę, która tłumaczy tę utratę. Zgodnie z moją hipotezą niekontrolowany podział pochłoniętych sinic wewnątrz fagosomu powodował jego rozerwanie i wydostawanie się sinic do cytozolu gospodarza. Hipoteza ta tłumaczy chimeryczną, eukariotyczno-prokariotyczną naturę błony zewnętrznej plastydów pierwotnych. Jest możliwe, że – podczas wydostawania się sinic z fagosomu – ich błona zewnętrzna nabyła lipidy i białka eukariotyczne.

Założyłem w moim modelu, że utrata błony fagosomalnej dokonała się bardzo wcześnie w ewolucji plastydów pierwotnych. Na korzyść tego założenia przemawia kilka argumentów, której przytoczyłem w pracy z [BioEssays \(2009\)](#). Na przykład utrata błony fagosomalnej umożliwiłaby pomyślne podziały sinic w cytozolu gospodarza, ponieważ ich plazmalemma i błona zewnętrzna były już zdolne do wzrostu i podziału. Ponadto utrata tej błony umożliwiłaby import białek. Jednym z pierwszych etapów w tym procesie mogło być spontaniczne włączenie tuneli błonowych, takich jak OEP24 i OEP37, do zewnętrznej błony plastydowej. W następnym etapie zostałby włączony Toc75 w odwróconej topologii, co mogłoby zapoczątkować import białek kodowanych przez jądro. Pomija się często, że gospodarzem w pierwotnej endosymbiozie był fagotroficzny protist, co sugeruje, że jego genom zawierał liczne geny sinicowe, które mogły posiadać potencjalne sekwencje kierujące lub nabyć takie sekwencje od białek mitochondrialnych. Obecność tych genów wywierałaby silną presję selekcyjną na utratę błony fagosomalnej przez pochłonięte sinice.

Chromatofory *Paulinella chromatophora* jako organelle komórkowe

Publikacje:

Bodył A., Mackiewicz P., Stiller J.W. (2007) *The intracellular cyanobacteria of Paulinella chromatophora: endosymbionts or organelles?* **Trends in Microbiology** 15: 295–296.

Bodył A., Mackiewicz P., Stiller J.W. (2010) *Comparative genomic studies suggest that the cyanobacterial endosymbionts of the amoeba Paulinella chromatophora possess an import apparatus for nuclear-encoded proteins.* **Plant Biology** 12: 639–649.

Cele badań:

- przedstawienie argumentów na poparcie hipotezy, że chromatofory *Paulinella chromatophora* są organellami komórkowymi;
- identyfikacja homologów *Toc* i *Tic* w genomie chromatoforowym;
- określenie przypuszczalnych funkcji homologów *Toc* i *Tic* u *P. chromatophora*;
- rekonstrukcja systemu importu białek w chromatoforach;
- zaproponowanie hipotez tłumaczących mechanizmy importu białek do chromatoforów.

Paulinella chromatophora jest amebą skorupkową tworzącą filopodia, która należy do gromady Cercozoa (Burki 2014). Charakterystyczną cechą komórek *P. chromatophora* jest obecność dwóch chromatoforów, które wyewoluowały z pochłoniętej wcześniej sinicy. Chromatofory posiadają dwie błony otoczkowe i są ściśle zintegrowane z ich gospodarzem, np. wymieniają różne metabolity z jego cytozolem (Bodył i in. 2017a). Struktury te przypominają plastydy pierwotne, a szczególnie plastydy glaukofitów, ponieważ utrzymują one ciągle peptydoglikan pomiędzy swoją zewnętrzną i wewnętrzną błoną otoczkową. Jednak analizy filogenetyczne genów chromatoforowych wykazały, że chromatofory wyewoluowały niezależnie od plastydów pierwotnych (Marin i in. 2005). W zgodzie z tymi analizami *P. chromatophora* należy do supergrupy Rhizaria, a glony z plastydami pierwotnymi do supergrupy Archaeplastida (Burki 2014).

Praca z *Trends in Microbiology* (2007) poświęcona jest statusowi ewolucyjnemu chromatoforów. Postawione przeze mnie kluczowe pytanie brzmiało: czy struktury te są jeszcze endosymbiontami, czy może uległy już one transformacji w organelle komórkowe? W pracy tej przedstawiłem argumenty, które pokazują, że chromatofory są organellami. Argumenty te zostały pominięte przez wcześniejszych autorów.

Publikacja pierwszych danych molekularnych o chromatoforach wywołała dyskusję o ich status ewolucyjny. Dyskusja ta toczyła się w 2006 r. na łamach prestiżowego *Curent Biology*. Yoon i in. (2006) oraz Bhattacharya i Archibald (2006) sugerowali, że chromato-

fory osiągnęły już status organelli, podczas gdy [Theissen i Martin \(2006\)](#) dowodzili, że są one ciągle endosymbiontami. W pracy z [Trends in Microbiology \(2007\)](#) kontynuowałem tę dyskusję. Przedstawiłem w niej szereg ważnych argumentów, które wskazują, że chromatofory są organellami. Poniżej wymieniam niektóre z nich.

Po pierwsze, złożone systemy import białek wyewoluowały niezależnie co najmniej dwa razy w przypadku mitochondriów i plastydów pierwotnych. Po drugie, powstanie translokonów Tom i Tim (mitochondria) oraz translokonów Toc i Tic (plastydy pierwotne) jest przykładem „majsterkowania ewolucyjnego”, w którym zostały wykorzystane białka istniejące wcześniej zarówno u gospodarza, jak i u endosymbionta. Po trzecie, sekwencje kierujące przypominające peptydy tranzytowe mogły występować już w białkach bakteryjnych przodków mitochondriów i plastydów pierwotnych.

W pracy z [Trends in Microbiology \(2007\)](#) sformułowałem jeszcze jeden bardzo ważny argument na poparcie hipotezy, że chromatofory są organellami. Argument ten oparty jest na modelu ewolucji systemów transportu białek w mitochondriach i plastydach pierwotnych, który zaproponował [Cavalier-Smith \(2006\)](#). Jego publikacja stała się dla mnie bezpośrednią inspiracją do zastosowania go do chromatoforów oraz napisania tej pracy teoretycznej. Model Cavaliera-Smitha postuluje gradualistyczną ewolucję translokonów mitochondrialnych i plastydowych, pokazując, że ich powstanie nie było aż tak trudne, jak to wcześniej podkreślano.

Jest bardzo prawdopodobne, że import białek zachodzi nie tylko do chromatoforów, ale również do innych bakteryjnych endosymbiontów. W pracy z [Trends in Microbiology \(2007\)](#) wskazałem kolejnych kandydatów na nowe organelle komórkowe. Kandydatami tymi są bakterie α -purpurowe występujące w komórkach owadów oraz sinice występujące w komórkach okrzemek. Pierwsze endosymbionty uczestniczą w biosyntezie aminokwasów, a drugie – w wiązaniu azotu cząsteczkowego.

W pracy z [Plant Biology \(2010\)](#) zawarłem nowe dane bioinformatyczne, razem z nowymi modelami i hipotezami, które pokazują, że w chromatoforach *P. chromatophora* wyewoluował system importu białek. To wskazuje, że chromatofory są rzeczywiście organellami. Praca ta została scharakteryzowana przez [prof. Johna Archibalda](#) w jego książce „One plus one equals one” wydanej przez prestiżowe wydawnictwo Cambridge w 2014 r. Charakterystykę tę można znaleźć na stronach 162 i 163.

[Nowack i in.](#) opublikowali w 2008 r. pierwszą, kompletną sekwencję genomu chromatoforowego. Praca ta była dla mnie ważna z jednego zasadniczego powodu. Kompletna sekwencja tego genomu umożliwiła przetestowanie mojej hipotezy, że chromatofory

zawierają system importu białek, który przypomina – co najmniej częściowo – translokony Toc i Tic w plastydach pierwotnych.

Hipoteza, że chromatofory posiadają system importu białek została przetestowana w oparciu o analizy bioinformatyczne, które wykonał dr hab. Paweł Mackiewicz. Analizy te wykazały, że genomy różnych gatunków sinic – włączając gatunki blisko spokrewnione z chromatoforami – kodują homologii kluczowych komponentów translokonów Toc i Tic, takie jak Toc12, Toc64, Toc75, Tic20, Tic21, Tic32, Tic55 i Tic62. W przeciwieństwie do tych genomów, genom chromatoforowy koduje homologii tylko Toc12, Toc64, Tic21 oraz Tic32.

Występowanie homologów Tic21 oraz Tic32 u *P. chromatophora* wskazuje, że wewnętrzna błona chromatoforowa posiada system transportu białek, który przypomina translokony Tic plastydów pierwotnych. Homolog Tic21 *P. chromatophora* związa się w cztery α -helisy tworzące domeny transbłonowe. Struktura tego białka wskazuje, że buduje ono w wewnętrznej błonie chromatoforowej kanał dla importowanych białek. Jak wspomniano wcześniej, białko Tic32 – razem z białkami Tic55 oraz Tic62 – tworzy u roślin wyższych kompleks regulujący transport białek przez wewnętrzną błonę plastydową. Zaproponowałem, że homolog Tic32 *P. chromatophora* również pełni funkcję regulatorową. Jest bardzo prawdopodobne, że geny kodujące homologii Tic55 oraz Tic62 zostały przeniesione do genomu jądrowego *P. chromatophora*, a ich produkty białkowe importowane są do chromatoforów, umożliwiając regulację transportu białek przez ich błonę wewnętrzną.

Przeprowadzone analizy bioinformatyczne wykazały, że genom chromatoforowy nie posiada genu kodującego homolog Toc75. W celu wytłumaczenia nieobecności tego genu przedstawiłem w pracy z [Plant Biology \(2010\)](#) dwa różne scenariusze ewolucyjne. Pierwszy scenariusz: gen kodujący białko Toc75 został przeniesiony do genomu jądrowego *P. chromatophora* i jego produkt białkowy jest importowany, a następnie włączany do zewnętrznej błony chromatoforowej. Drugi scenariusz: gen ten został utracony i zewnętrzna błona chromatoforowa nie posiada homologu Toc75. W takim przypadku białka kodowane przez genom jądrowy *P. chromatophora* mogłyby być transportowane do chromatoforów przez system błon wewnętrznych. Białka te byłyby początkowo kierowane do światła ER, a następnie dostarczane do chromatoforów w pęcherzykach transportowych. Po fuzji takiego pęcherzyka z zewnętrzną błoną chromatoforową importowane białka byłyby uwalniane do przestrzeni peryplazmatycznej, skąd – przy użyciu translokony przypominającego Tic – przechodziłyby do matriks chromatoforu. W zgodzie z tą hipotezą niektóre białka – takie jak α -amylaza i anhidraza α -węglanowa – transportowane są do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych, tak jak omawiano to wcześniej.

Transport białek do chromatoforów przez system błon wewnętrznych nie wyklucza, że zewnętrzna błona chromatoforowa zawiera kanały przypominające białko Toc75.

W pracy z *Plant Biology* (2010) zasugerowałem, że do błony tej mógł zostać przeniesiony kanał transportujący białka z mitochondriów. Hipotezę tę wspiera występowanie w błonie zewnętrznej plastydów roślin zielonych kanału OEP16, który uczestniczy w transporcie oksydoreduktazy protochlorofilidowej typu A. Jest bardzo prawdopodobne, że kanał ten wyewoluował z białka Tim22, które zostało relokowane z wewnętrznej błony mitochondrialnej do zewnętrznej błony plastydowej.

EWOLUCJA PLASTYDÓW CHROMALWEOLATOWYCH I KIEROWANIE ICH BIAŁEK KODOWANYCH PRZEZ GENOM JĄDROWY DO INNYCH KOMPARTYMENTÓW NIŻ PLASTYD

Krytyka hipotezy Chromalveolata

Publikacje:

Bodył A. (2005) *Do plastid-related characters support the chromalveolate hypothesis?* **Journal of Phycology** 41: 712–719.

Bodył A., Moszczyński K. (2006) *Did the peridinin plastid evolve through tertiary endosymbiosis? A hypothesis.* **European Journal of Phycology** 41: 435–448.

Cele badań:

- krytyczna analiza założeń, na których oparta jest hipoteza Chromalveolata;
- przegląd pomyslnych transformacji endosymbionta w organellum;
- określenie trudności w utracie plastydów;
- zaproponowanie nowej interpretacji drzew filogenetycznych dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) oraz aldolazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej (FBA);
- przedstawienie nowego modelu ewolucji plastydów chromalweolatowych.

Cavalier-Smith zaproponował w 1999 r. hipotezę Chromalveolata. Hipoteza ta stała się bardzo szybko popularna i trafiła do książek, również do podręczników biologii ogólnej. Można o niej przeczytać na przykład w *Biologii Campbella i in.* (2013) (s. 582–589) oraz *Biologii Solomon i in.* (2014) (s. 544–551). Zgodnie z hipotezą Chromalveolata wspólny przodek Chromista [kryptofity, heterokonty (=stramenopile), haptofity] i Alveolata [orzęski, bruzdnice (=dinoflagellaty), apikopleksy] pochłonął krasnorost, który uległ następnie

transformacji w złożony plastyd. Plastyd ten był otoczony początkowo przez cztery błony i posiadał kompartment periplastydowy z nukleomorfem. Jednak plastydy chromalweolowe różnią się pomiędzy sobą w znaczący sposób pod względem różnych cech ultrastrukturalnych. Na przykład najbardziej zewnętrzna błona plastydów chromistowych nosi rybosomy i została nazwana plastydowym retikulum endoplazmatycznym (PER). Dlatego Cavalier-Smith postulował, że ancestralny plastyd chromalweolowy ulegał różnym modyfikacjom w poszczególnych liniach filogenetycznych chromistów i alweolatów. W niektórych z tych linii (np. u orzęsków) musiało również dojść do jego utarty.

W pracy z *Journal of Phycology* (2005) przedstawiłem pierwszą, kompletną i poważną krytykę hipotezy Chromalveolata. W czasie kiedy się ona ukazała, hipoteza chromalweolowa uzyskała już status paradygmatu i dane publikowane przez różnych autorów były interpretowane w jego kontekście teoretycznym. Wówczas niewielu badaczy powątpiewało w prawdziwość hipotezy Chromalveolata i moja praca stanowiła rodzaj „herezji” w myśleniu o ewolucji plastydów chromalweolowych. Prof. Jeffrey Palmer, jeden z najwybitniejszych współczesnych biologów ewolucyjnych, określił pracę z *Journal of Phycology* (2005) jako silne wyzwanie dla tej hipotezy. Opinia ta znajduje się w dodatkowym pliku nr 8 (*Additional file 8: Discussion of chromalveolate hypothesis and algal phylogeny*) do jego pracy „An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters”, która ukazała się w 2006 r. w *BMC Biology*.

Praca z *Journal of Phycology* (2005) zawiera cztery główne argumenty przeciw paradygmatowi chromalweolowemu. Argumenty te reprezentują także nowe hipotezy i zasady w interpretacji szlaku ewolucyjnego plastydów chromalweolowych. Pierwszy argument: transformacje endosymbionta w organellum nie są wyjątkowo rzadkimi zdarzeniami ewolucyjnymi. Inspiracją do zaproponowania hipotezy Chromalveolata stała się zasada minimalizacji zdarzeń endosymbiotycznych. W pracy tej dowodzę, że w historii naszej biosfery było co najmniej osiem pomyślnych transformacji endosymbionta w organellum: trzy symbiogenezy pierwotne (mitochondria, plastydy pierwotne, chromatofory *Paulinella chromatophora*), cztery symbiogenezy wtórne (plastydy euglenidów, plastydy chlorarachniofitów, plastydy *Lepidodinium*, plastydy chromalweolowe – oczywiście, przy założeniu, że hipoteza Chromalveolata jest prawdziwa) oraz jedna symbiogeneza trzeciorzędowa (plastydy fukoksantynowe *Karenia* i *Karlodinium*).

W pracy z *Journal of Phycology* (2005) podałem jeszcze trzy inne przykłady udanych transformacji endosymbionta w organellum: (1) hydrogenosomy *Trichomonas*; (2) endosymbionty okrzemkowe *Kryptoperidinium* i *Durinskia* oraz (3) plastydy *Dinophy-*

sis. W przypadku hydrogenosomów *Trichomonas* okazało się, że miały one wspólnego przodka z pozostałymi hydrogenosomami oraz mitochondriami (Roger i in. 2017). Endosymbionty okrzemkowe *Kryptoperidinium* i *Durinskia* utrzymują ciągle swoje jądra i mitochondria, ale mogą one importować pewne białka (np. transportery błonowe), które byłyby włączane do pojedynczej błony oddzielającej ich cytozol od cytozolu gospodarza (Gagat i in. 2014). Plastydy *Dinophysis* są kleptoplastydami, ale mogą importować białka (Wise-caver i Hackett 2010) i wykazują zdolność do podziału (Rusterholz i in. 2017). Tym samym, zarówno endosymbionty okrzemkowe *Kryptoperidinium* i *Durinskia*, jak i kleptoplastydy *Dinophysis* są dobrymi kandydatami na organelle komórkowe.

Drugi argument: poważne trudności w utracie plastydów. Jedną z bardzo ważnych implikacji hipotezy Chromalveolata jest założenie licznych utrat plastydów. Na przykład takie utraty musiałyby się zdarzyć nie tylko u wspólnego przodka orzęsków, ale również we wcześnie odgałęziających się heterotroficznych liniach bruzdnic, kryptofitów i heterokontów.

W pracy z *Journal of Phycology* (2005) zwróciłem uwagę, że plastydy pełnią bardzo ważne funkcje nefotosyntetyczne, takie jak biosynteza hemu, kwasów tłuszczowych, izoprenoidów i aminokwasów. Dlatego są one zachowywane przez komórki heterotroficznych protistów nawet wtedy, kiedy doszło u nich do utraty zdolności do fotosyntezy. W pracy tej podałem przykłady takich nefotosyntetycznych plastydów, np. plastyd występujący u heterotroficznej eugleniny *Euglena* (wcześniej *Astasia*) *longa*. Kolejnym, zaskakującym przykładem jest apikoplast wykryty u apikompleksów, które są obligatoryjnymi pasożytami wewnątrzkomórkowymi.

Interesujący przykład trudności w utracie plastydów, który również opisałem w pracy z *Journal of Phycology* (2005), dostarczają heterotroficzne heterokonty *Pteridomonas danica* oraz *Ciliophrys infusionum*. Cavalier-Smith sugerował wcześniej utratę plastydów u *P. danica* oraz *C. infusionum*, ale późniejsze badania ultrastrukturalne, biochemiczne i genetyczne wykazały, że organelle te są ciągle utrzymywane w ich komórkach. Chociaż plastydy *P. danica* oraz *C. infusionum* są zredukowane, to jednak zachowały one charakterystyczne cechy plastydów heterokontowych, takie jak (1) cztery błony otoczkowe; (2) rybosomy przy-czepione do najbardziej zewnętrznej błony oraz (3) połączenie pomiędzy plastydem a jądrem.

Założenie poważnych trudności w utracie plastydów stanowi ważną zasadę w rekonstrukcji szlaku ewolucyjnego nie tylko plastydów chromalweolatowych, ale również innych plastydów. Biorąc pod uwagę te trudności, zaproponowałem, że bruzdnice, apikompleksy, kryptofity, stramenopile oraz haptofity otrzymały swoje plastydy niezależnie po zróżnicowaniu ich heterotroficznych przodków.

Trzeci argument: pochodzenie trzeciorzędowe plastydu peridininowego. Hipoteza Chromalveolata zakłada, że plastyd ten wyewoluował w wyniku wtórnej endosymbiozy z krasnorostu. Ancestralny plastyd chromalweolatowy był otoczony przez cztery błony, ale plastyd peridininowy otoczony jest tylko przez trzy błony, co oznacza, że jedna z jego pierwotnych błon musiała zostać utracona. Cavalier-Smith założył, że utracona została błona periplastydowa wywodząca się z plazmalemmy krasnorostu. W pracy z *Journal of Phycology* (2005) zwróciłem uwagę, że utrata tej błony byłaby traumatyczna dla gospodarza z dwóch powodów. Po pierwsze, zaburzyłaby ona podział plastydów endosymbionta i jego jądra. Po drugie, uniemożliwiłaby ona transport importowanych białek przez otoczkę plastydową do stromy.

Uwzględnienie powyższych trudności doprowadziło mnie do sformułowania hipotezy, zgodnie z którą plastyd peridininowy wyewoluował na drodze trzeciorzędowej endosymbiozy z glonu zawierającego wtórny plastyd, np. haptofita. Na poparcie tej hipotezy przytoczyłem kilka argumentów, np. u bruzdnicy występuje kilka różnych typów plastydów, które zostały nabyte dzięki trzeciorzędowym endosymbiozom. Ponadto jeden z tych plastydów, pozyskany od haptofita i nazwany plastydem fukoksantynowym, przypomina plastyd peridininowy. Można by jeszcze postulować niezależne pochodzenie krasnorostowego plastydu peridininowego, ale ja odrzuciłem tę hipotezę, ponieważ zakłada ona wielokrotne powstanie chlorofilu *c*.

Czwarty argument: nowa interpretacja drzew filogenetycznych dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH). Drzewa filogenetyczne dehydrogenazy aldehydu 3-fosfoglicerynowego (GAPDH) były traktowane jako kluczowy dowód na prawdziwość hipotezy Chromalveolata (Fast i in. 2001). W pracy z *Journal of Phycology* (2005) jako pierwszy zaproponowałem alternatywną interpretację tych drzew, która poddaje w wątpliwość paradygmat chromalweolatowy. Plastidy chromistów i alweolatów importują białko GAPDH, ale jego źródłem nie był krasnorost. Filogenezy białka GAPDH wykazały, że jego forma plastydowa u chromistów i alweolatów wywodzi się od białka cytozolowego gospodarza. Wcześniejsi autorzy zaproponowali, że u wspólnego przodka Chromista i Alveolata gen kodujący cytozolowe białko GAPDH uległ duplikacji, dając początek formie plastydowej, która została następnie skierowana do ancestralnego plastydu chromalweolatowego, podstawiając jej homolog pochodzący od krasnorostu.

W pracy z *Journal of Phycology* (2005) przedstawiłem trzy główne argumenty przeciw tej interpretacji. Po pierwsze, hipotetyczny wspólny przodek Chromista i Alveolata był heterotrofem, co oznacza, że jego genom zawierał tylko niewiele genów z dwuczęściowymi pre-sekwencjami zdolnymi do kierowania kodowanych przez nie białek do ancestralnego plastydu chromalweolatowego. Tym samym kopia plastydowa cytozolowego

białka GAPDH nie mogłaby nabyć kompletnej plastydowej sekwencji kierującej w jednym „kroku”, np. w wyniku tasowania egzonów. Dlatego znacznie bardziej prawdopodobne jest, że duplikacja cytozolowego białka GAPDH dokonała się u fotosyntetycznego chromalweolata, którego genom kodował już setki białek plastydowych z kompletnymi dwuczęściowymi pre-sekwencjami kierującymi. Po drugie, cytozolowe białka GAPDH kryptofitów odłączają się na zewnątrz kładu cytozolowych białek GAPDH chromalweolatów, łącząc się z białkami zwierzęcymi. Po trzecie, haptofitowy przodek plastydu peridininowego mógł już zawierać plastydowe i cytozolowe białka GAPDH, których geny zostałyby przeniesione do genomu jądrowego gospodarza bruzdnicowego, podstawiając geny, które występowały pierwotnie w jego genomie. To oznacza, że grupowanie się sekwencji plastydowych i cytozolowych białek GAPDH bruzdnic i haptofitów może wynikać nie z dziedziczenia wertykalnego, ale z horyzontalnego transferu genów.

Zgodnie z moją hipotezą, duplikacja genu kodującego cytozolowe białko GAPDH nastąpiła w jednej z później odgałęziających się linii haptofitów, która posiadała już plastyd. Geny kodujące plastydowe i cytozolowe białka GAPDH zostałyby następnie przekazane do pozostałych linii chromalweolatowych dzięki trzeciorzędowym endosymbiozom, utrudniając bardzo poważnie rekonstrukcję szlaku ewolucyjnego plastydów chromalweolatowych.

W pracy z *European Journal of Phycology* (2006), która ukazała się jako oryginalny artykuł, kontynuowałem moją wcześniejszą dyskusję o pochodzeniu plastydu peridininowego, dowodząc że wyewoluował on w następstwie trzeciorzędowej endosymbiozy. W oryginalnej hipotezie chromalweolatowej grupą siostrzaną dla alweolatów, obejmujących bruzdnice, jest cały kład chromistowy z kryptofitami, heterokontami i haptofitami. Tym samym, plastyd peridininowy wyewoluowałby z plastydu czterobłonowego przypominającego plastyd kryptofitowy. Plastyd ten byłby otoczony przez cztery błony, posiadałby kompartment periplastydowy z nukleomorfem, a jego najbardziej zewnętrzna błona byłaby pozbawiona rybosomów.

Yoon i in. opublikowali w 2005 r. drzewa filogenetyczne czterech genów plastydu peridininowego, na których sekwencje plastydu peridininowego łączyły się nie z sekwencjami wszystkich plastydów chromistowych, a tylko z sekwencjami plastydów heterokontowych. Opierając się na tych wynikach, autorzy zaproponowali nową wersję hipotezy Chromalveolata, która postuluje, że plastyd peridininowy wyewoluował z plastydu heterokontowego dziedziczony wertykalnie, a nie horyzontalnie. Jednak nowa wersja hipotezy chromalweolatowej napotyka na bardzo poważne trudności, które ją falsyfikują.

W pracy z *European Journal of Phycology* (2006) udowodniłem, dlaczego transformacja plastydu heterokontowego w plastyd peridininowy, podczas ich wertykalnego dziedziczenia, byłaby niemożliwa. Najbardziej zewnętrzna błona plastydu heterokontowego posiada rybosomy, podczas gdy najbardziej zewnętrzna błona plastydu peridininowego jest ich pozbawiona. Dlatego akceptując hipotezę Yoon i in. (2005), trzeba by założyć, że plastyd heterokontowy utracił najbardziej zewnętrzną błonę z rybosomami, ale taka utrata uniemożliwiałaby import jego białek kodowanych przez genom jądrowy. Białka te byłyby „uwięzione” w systemie błon wewnętrznych, ponieważ pęcherzyki wywodzące się z tego systemu pozostawałyby niezdolne do fuzji z nową najbardziej zewnętrzną błoną plastydu peridininowego, która odpowiadałaby błonie periplastydowej, czyli plazmalemmie krasnorostu. Niezdolność do importu białek doprowadziłaby ostatecznie do degeneracji plastydu peridininowego, co oznacza, że utrata najbardziej zewnętrznej błony plastydowej z rybosomami przez plastyd heterokontowy zostałaby odrzucona przez dobór naturalny.

Biorąc pod uwagę powyższe trudności, zaproponowałem alternatywną interpretację drzew filogenetycznych otrzymanych przez Yoon i in. (2005). Zgodnie z moją hipotezą, przodek bruzdnic „połknął” heterokonta, który następnie uległ transformacji w plastyd peridininowy, ale transformacja ta byłaby związana z dziedziczeniem horyzontalnym, a nie wertykalnym.

W pracy z *European Journal of Phycology* (2006) udoskonaliłem moje wcześniejsze argumenty na poparcie trzeciorzędowego pochodzenia plastydu peridininowego. Wskazałem na przykład dalsze podobieństwa pomiędzy plastydem peridininowym i plastydem fuksantynowym, takie jak trzyczęściowa struktura ich presekwencji, które składają się z peptydu sygnałowego, peptydu tranzytowego i domeny hydrofobowej zaczepiającej białko w błonie. Ponadto sformułowałem argumenty przeciw przypuszczeniu, że plastydy we wcześnie odgałęziających się liniach filogenetycznych bruzdnic i heterokontów uczestniczyły tylko w metabolizmie węglowodanowym, co umożliwiłoby ich częste utraty.

Praca z *European Journal of Phycology* (2006) zawiera również hipotezę, która może stać się w przyszłości ważną zasadą w rekonstrukcji szlaków ewolucyjnych plastydów. Hipoteza chromalweolatowa postuluje, że otoczka ancestralnego plastydu chromalweolatowego ulegała różnym modyfikacjom w nowo powstających liniach filogenetycznych, np. traciła ona niektóre błony lub nabywała rybosomy. W pracy tej dowodzę, że otoczki plastydowe są wyjątkowo stabilne w ewolucji. Jako dowód na taką stabilność przytoczyłem plastydy pierwotne. Chociaż plastydy te uległy dużej dywergencji, to jednak są one ciągle otoczone przez dwie błony. Dlatego – zgodnie z moją hipotezą – jeśli dojdzie do ustanowienia plastydu jako organellum komórkowego, to jego otoczka nie ulega już żadnym modyfikacjom, ponieważ mogłyby one zaburzyć import białek. Jedną z implikacji

tej hipotezy jest niezależne pochodzenie plastydu peridininowego (trzy błony otoczkowe), plastydu apikomplexowego (cztery błony otoczkowe, brak rybosomów na najbardziej zewnętrznej błonie) oraz plastydu heterokontowego (cztery błony otoczkowe, obecność rybosomów na najbardziej zewnętrznej błonie).

W pracy z *European Journal of Phycology* (2006) przedstawiłem również nową interpretację drzew filogenetycznych aldolazy fruktozo-1,6-dwufosforanowej (FBA). Jak w przypadku białka GAPDH, filogenezy tego białka były przytaczane jako dowód na poparcie hipotezy Chromalveolata (Patron i in. 2004). Zaproponowałem hipotezę, która w nowy sposób tłumaczy strukturę drzew białka FBA. Białko to nie nadaje się do rekonstrukcji szlaku ewolucyjnego plastydów chromalweolatowych, ponieważ jego geny ulegały często horyzontalnym transferom.

Nowy model ewolucji plastydów chromalweolatowych

Publikacja:

Bodył A. (2018) *Did some red alga-derived plastids evolve via kleptoplastidy? A hypothesis.* **Biological Reviews** 93: 201–222.

Cele badań:

- krytyczna analiza założeń, na których oparte są współczesne modele ewolucji plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego;
- analiza systemów kleptoplastydowych u orzęsków i bruzdnic;
- zaproponowanie nowych ogólnych modeli ewolucji plastydów chromalweolatowych;
- rekonstrukcja głównych etapów w transformacji haptofita w plastyd peridininowy;
- zastosowanie nowych modeli ewolucji plastydów chromalweolatowych do plastydów heterokontowych i haptofitowych.

Krytyka hipotezy Chromalveolata, którą zapoczątkowałem i w której później aktywnie uczestniczyłem (np. Bodył i in. 2009), doprowadziła ostatecznie do jej odrzucenia. Obecnie żaden badacz nie jest gotowy do zaakceptowania hipotezy chromalweolatowej. Nie oznacza to jednak, że zagadka ewolucji plastydów chromalweolatowych została już całkowicie rozwiązana.

W pracy z *Biological Reviews* (2018) przedstawiłem całkowicie nowe spojrzenie na ewolucję plastydów chromalweolatowych. Pierwsza część tej pracy zawiera krytykę

podstawowych założeń, na których oparte są współczesne modele ewolucji plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego. Modele te postulują na przykład, że jedynym sposobem na pozyskanie plastydu przez komórkę eukariotyczną jest fagocytoza. Zwróciłem uwagę, że u drapieżnych protistów wyewoluowały różne strategie pochłaniania całych komórek glonów lub ich wybranych organelli, takich jak plastydy i jądra. Szczególnie ciekawe przykłady dostarczają bruzdnice, u których – oprócz fagocytozy – wykształciły się wysoce wyspecjalizowane mechanizmy odżywiania, wykorzystujące struktury takie jak pallium, fagopod i szypułka. Ostatnia z tych struktur zaangażowana jest w osobliwy proces myzocytozy. Bruzdnicę myzocytotyczną przebija plazmalemma glonu przy pomocy szypułki i „wysysa” zawartość jego komórki do jednego lub kilku fagosomów. Podczas tego mechanizmu odżywiania plazmalemma ofiary pozostaje na zewnątrz drapieżnej bruzdnicy, demonstrując, w jaki sposób może dojść do redukcji błon podczas ewolucji plastydów eukariotycznych.

Innym założeniem współczesnych modeli ewolucji plastydów chromalweolatowych – które poddałem w wątpliwość – jest, że import białek może rozpocząć się dopiero po ustanowieniu stałej endosymbiozy. Bakterie symbiotyczne z rodzaju *Rhizobium* są niestabilnymi endosymbiontami, które otoczone są w komórce gospodarza specjalną błoną znaną jako błona symbiosomalna. Błona ta zawiera liczne transportery umożliwiające efektywną wymianę różnych związków pomiędzy bakterią a gospodarzem. Symbiosomy z bakteriami *Rhizobium* importują ponad 200 białek, ale nie wszystkie z nich wyposażone są w peptydy sygnałowe, co wskazuje na istnienie różnych mechanizmów transportu do tego kompartmentu. Przypadek bakterii *Rhizobium* jasno pokazuje, że import białek może wyewoluować nawet przed ustanowieniem stałej endosymbiozy.

Poważne wyzwanie dla współczesnych modeli ewolucji plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego dostarczają kleptoplastydy, które pokazują na jak różnych drogach mogą być nabywane plastydy. Kleptoplastydy są nietrwałymi strukturami fotosyntetycznymi, które „pożyczają” od glonów różne heterotroficzne protisty. W pracy z *Biological Reviews* (2018) skoncentrowałem się na dwóch bardzo zaawansowanych ewolucyjnie systemach kleptoplastydowych. Pierwszy system występuje u orzęska *Mesodinium rubrum* odżywiającego się kryptofitami. Orzęsek ten wchłania tylko określone organelle od swojej ofiary i umieszcza je w oddzielnych kompartmentach. Pierwszy kompartment zawiera plastyd i mitochondrium, natomiast drugi – jądro nazwane kleptokarionem. Jest bardzo prawdopodobne, że istnieje ścisła komunikacja pomiędzy oboma tymi kompartmentami. U kryptofitów plastyd połączony jest z jądrem, co oznacza, że *M. rubrum* musi posiadać zdolność do rozdzielania tych organelli podczas odżywiania. Drugi osobliwy system kleptoplastydowy opisano u bruzdnicy z rodzaju *Dinophysis*. Bruzdnice te pozyskują

również kleptoplastydy pochodzenia kryptofitowego, ale pobierają je nie bezpośrednio od kryptofitów, a pośrednio od *M. rubrum*. Plastydy kryptofitów otoczone są przez cztery błony, natomiast kleptoplastydy bruzdnic *Dinophysis* tylko przez dwie. Bruzdnice te posiadają zdolność do usuwania dwóch najbardziej zewnętrznych błon z plastydów kryptofitowych. Ponadto niekompletny plastyd – umieszczony w fagosomie – otaczany jest przez specjalne pęcherzyki, które umożliwiają jego „ucieczkę” do cytozolu gospodarza.

W drugiej części pracy z *Biological Reviews* (2018) zaproponowałem dwa nowe modele ewolucji plastydów chromalweolatowych. Pierwszy model zakłada, że gospodarzami dla tych plastydów były drapieżne protisty z wysoce wyspecjalizowanymi mechanizmami odżywiania. Zasugerowałem, że – jeszcze przed ustanowieniem plastydu – wykształciły one co najmniej dwie z następujących cech: (1) pozyskiwanie plastydów na drodze myzocytozy; (2) wstrzymywanie trawienia „połkniętych” plastydów; (3) eliminacja nie tylko plazmalemmy glonu, ale również błon otoczkowych jego plastydu podczas odżywiania; (4) uwalnianie wchłoniętych plastydów z fagosomu do cytozolu gospodarza oraz (5) pobieranie wybranych organelli, takich jak plastydy i jądra. Ponadto gospodarze ci mogli posiadać liczne białka (np. transportery błonowe), które byłyby kierowane do nabytych kleptoplastydów.

Drugi model postuluje, że gospodarze dla plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego umieszczali wchłonięte plastydy i jądra glonów w oddzielnych kompartmentach: plastydy w kompartmentie kleptoplastydowym, a jądra w kompartmentie kleptokarionowym. Każdy z tych kompartmentów byłby otoczony przez błonę symbiosomalną z licznymi transporterami. Pęcherzyki transportowe odłączające się od błony symbiosomalnej, otaczającej kompartment kleptokarionowy, transportowałyby białka i transkrypty do kompartmentu kleptoplastydowego. Drapieżny protist również transportowałby swoje różne białka do obu kompartmentów w pęcherzykach transportowych wywodzących się z jego systemu błon wewnętrznych.

Zaproponowane przeze mnie nowe modele ewolucji plastydów chromalweolatowych różnią się bardzo wyraźnie od modeli klasycznych. Modele te zakładają, że jedyną egzaptacją u gospodarzy dla plastydów eukariotycznych pochodzenia krasnorostowego była ich zdolność do fagocytozy i że gospodarze ci pochłaniali całe komórki glonów i umieszczali je w jednym kompartmentie.

W trzeciej części pracy z *Biological Reviews* (2018) zastosowałem nowe modele ewolucji plastydów chromalweolatowych do plastydu peridininowego. Zaproponowałem, że myzocytotyczny przodek bruzdnic pozyskiwał od haptofita jego plastydy oraz jądra i umieszczał je w oddzielnych kompartmentach otoczonych błonami symbiosomalnymi. Gospodarz ten kierowałby do kompartmentu kleptoplastydowego białka pochodzące od

haptofita przez jego system błon wewnętrznych, ale nie mogłyby one przechodzić przez najbardziej zewnętrzną błonę plastydu haptofitowego. Dlatego zasugerowałem, że przodek bruzdnicy usuwał tę błonę, razem z błoną periplastydową, podczas odżywiania lub trawił obie błony precyzyjnie po wchłonięciu kompletnego plastydu. W przeciwieństwie do modelu tradycyjnego, model ten wyjaśnia, dlaczego dobór naturalny popierał utratę błon podczas ewolucji plastydu peridininowego. Założyłem również, że kleptokarion haptofitowy był aktywny transkrypcyjnie. Białka plastydowe byłyby transportowane do systemu błon wewnętrznych w kompartmentie kleptokarionowym i nie mogłyby docierać do kompartmentu kleptoplastydowego. Jednak do tego kompartmentu i występującego w nim niekompletnego plastydu haptofitowego mogły być transportowane białka mitochondrialne. Regularne trawienie kleptokarionów umożliwiłoby transfer licznych genów plastydowych do genomu jądrowego gospodarza i ostatecznie utratę kompartmentu kleptokarionowego.

W czwartej części pracy z *Biological Reviews* (2018) zaproponowałem kleptoplastydowe pochodzenie plastydów heterokontów i haptofitów. Zdecydowana większość heterotroficznych heterokontów odżywia się bakteriami, co uniemożliwiałoby pochłanianie całych komórek glonów. Ponadto u protistów tych występują osobliwe mechanizmy odżywiania, takie jak pseudopodium tworzące trofosom. W przypadku haptofitów ich grupą siostrzaną są Centrohelea, u których znaleziono zaawansowane systemy kleptoplastydów. Zasugerowałem również, że kleptoplastydy mogą występować u rappemonad, które są bardzo blisko spokrewnione z haptofitami.

W ostatniej części pracy z *Biological Reviews* (2018) omówiłem implikacje wynikające z moich modeli i hipotez. Pierwsza implikacja dotyczy definicji organelli komórkowych pochodzenia endosymbiotycznego, takich jak plastydy eukariotyczne, natomiast druga – konstrukcji chimerycznych organizmów z uproszczonym systemem importu białek do plastydów chromalweolatowych.

Kierowanie dysmutazy nadutlenkowej zawierającej żelazo do trzech różnych kompartmentów u bruzdnicy *Lingulodinium polyedrum*

Publikacja:

Bodył A., Mackiewicz P. (2007) Analysis of the targeting sequences of an iron-containing superoxide dismutase (SOD) of the dinoflagellate *Lingulodinium polyedrum* suggests function in multiple cellular compartments. *Archives of Microbiology* 187: 281–296.

Cele badań:

- analizy bioinformatyczne N-końcowej sekwencji kierującej Fe-SOD u bruzdnicy *Lingulodinium polyedrum*;
- analiza bioinformatyczna C-końcowego sygnału kierującego Fe-SOD *L. polyedrum*;
- przeszukiwanie transkryptów Fe-SOD *L. polyedrum* w celu znalezienia dodatkowych miejsc startu translacji;
- analiza kontekstów oligonukleotydowych, w których występują kodony AUG w transkryptach Fe-SOD *L. polyedrum*;
- analiza zdolności do tworzenia struktur „spinki do włosów” przez transkrypty Fe-SOD *L. polyedrum*;
- zaproponowanie modelu importu Fe-SOD *L. polyedrum* do różnych kompartmentów.

U roślin wyższych istnieje duża grupa białek plastydowych, które importowane są nie tylko do plastydów, ale również mitochondriów (Baudisch i in. 2014). Białka te noszą „dwuznaczą” N-końcową sekwencję kierującą, umożliwiającą ich transport do obu tych kompartmentów. Wśród białek podwójnie kierowanych do plastydów i mitochondriów są enzymy odpowiedzialne za neutralizację reaktywnych form tlenu, które tworzą się w dużych ilościach w tych organellach. Na przykład u roślin wyższych reduktaza glutationowa kierowana jest do plastydów i mitochondriów. Jednak u glonów z plastydami eukariotycznymi pochodzenia krasnorostowego i zielenicowego kierowanie białek plastydowych do mitochondriów wydaje się być problematyczne, ponieważ ich N-końcowe sekwencje kierujące składają się z peptydu sygnałowego i peptydu tranzytowego, podczas gdy białka importowane do mitochondriów noszą tylko peptydy tranzytowe.

Praca z *Archives of Microbiology* (2007) zawiera dane bioinformatyczne, które jasno pokazują, że dysmutaza nadtlenu zawierająca żelazo (Fe-SOD) u bruzdnicy *Lingulodinium polyedrum* kierowana jest do trzech różnych kompartmentów: plastydu, mitochondrium i peroksysomu. Jest to pierwszy opisany przypadek importu białka plastydowego z dwuczęściową presekwencją do innych kompartmentów niż plastyd nie tylko u bruzdnic, ale również u innych glonów z plastydami eukariotycznymi.

Wcześniejsze badania eksperymentalne wykazały, że białko Fe-SOD *L. polyedrum* transportowane jest do plastydu peridininowego. Jednak białko to nosi wyjątkowo krótką N-końcową sekwencję kierującą, która składa się z bardzo krótkiego regionu hydrofobowego oraz bardzo krótkiego regionu hydrofilowego. Biorąc pod uwagę osobliwe cechy tej presekwencji, zasugerowałem, że białko Fe-SOD *L. polyedrum* kierowane jest do innych

kompartmentów niż plastyd, np. do mitochondriów. Do przetestowania mojej hipotezy zostały wykorzystane analizy bioinformatyczne, które wykonał dr hab. Paweł Mackiewicz.

Analiza profilu hydrofobowości wykazała, że N-końcowa sekwencja kierująca Fe-SOD *L. polyedrum* posiada dwa regiony hydrofobowe, które otaczają odcinek hydrofilowy. Można by sugerować, że pierwszy region hydrofobowy działa jako peptyd sygnałowy, a drugi – jako sekwencja zaczepiająca białko w błonie. Z kolei odcinek hydrofilowy funkcjonowałby jako peptyd tranzytowy, umożliwiając przechodzenie tej dysmutazy przez dwie najbardziej wewnętrzne błony plastydowe odpowiadające otoczce plastydowej. Tym samym, Fe-SOD *L. polyedrum* należałaby do białek plastydowych klasy I z trzyczęściowymi presekwencjami. Jednak drugi region hydrofobowy składa się jedynie z sześciu reszt aminokwasowych i jego reszty hydrofobowe przerwane są przez polarną glutaminę. Ponadto w sąsiedztwie tego regionu występuje tylko jedna reszta naładowana dodatnio. Dane te wskazują, że drugi region hydrofobowy nie działa jako sekwencja zaczepiająca białko w błonie i że Fe-SOD *L. polyedrum* należy do białek plastydowych klasy II z dwuczęściowymi presekwencjami

Analizy bioinformatyczne wykazały, że region przypominający peptyd sygnałowy posiada słaby sygnał kierujący do ER. Biorąc pod uwagę te wyniki, zaproponowałem, że białko Fe-SOD *L. polyedrum* kierowane jest nie tylko do plastydu, ale również do mitochondrium. Zgodnie z moim modelem, związanie presekwencji z kompleksem SRP powoduje transport tej dysmutazy do ER (a następnie do plastydu), natomiast jej związanie z kompleksem NAC – transport do mitochondrium. Analizy bioinformatyczne potwierdziły moją hipotezę, że N-końcowa sekwencja kierująca Fe-SOD *L. polyedrum* posiada cechy mitochondrialnego peptydu tranzytowego. Ponadto presekwencja ta jest bardzo bogata w reszty zasadowe oraz nie zawiera żadnej reszty kwaśnej, czym przypomina mitochondrialne peptydy tranzytowe. Zasugerowałem także, że Fe-SOD *L. polyedrum* reprezentuje nową klasę białek nie tylko u bruzdnic, ale również u innych glonów z plastydami eukaryotycznymi. Białka te byłyby kierowane do plastydu i mitochondrium dzięki osobliwemu peptydowi sygnałowemu, który umożliwiałby interakcje z kompleksem NAC.

Białko Fe-SOD *L. polyedrum* zawiera nie tylko N-końcową sekwencję kierującą, ale również C-końcowy sygnał kierujący. C-koniec tego białka nosi trójpeptyd SKL, który reprezentuje peroksysomowy sygnał kierujący typu I (PTS1). Oprócz trójpeptydu SKL region sąsiadujący z tą sekwencją posiada kilka cech, które są charakterystyczne dla białek kierowanych do peroksysomów, np. argininę w pozycji -5 i prolinę w pozycji -10, licząc od końca-C. Analizy bioinformatyczne potwierdziły import białka Fe-SOD *L. polyedrum* do peroksysomu.

Występowanie w tym samym białku Fe-SOD *L. polyedrum* N-końcowej sekwencji kierującej oraz C-końcowego sygnału kierującego utrudniałoby jego kierowanie do różnych kompartmentów. Na przykład związanie presekwencji tej dysmutazy z kompleksem SRP lub NAC wykluczyłoby jej import do peroksysomu. Dlatego zaproponowałem, że ekspresja genu kodującego Fe-SOD *L. polyedrum* musi być regulowana, tak aby była możliwa synteza dwóch izoform tego białka: białka dłuższego z N-końcową sekwencją kierującą, które byłoby importowane do plastydu i mitochondrium oraz białka krótszego z C-końcowym sygnałem kierującym, które byłoby importowane do peroksysomu. Jednym z takich mechanizmów regulatorowych byłaby alternatywna translacja. W zgodzie z moją hipotezą, transkrypty białka Fe-SOD *L. polyedrum* zawierają dwa kodony AUG: kodon AUG1 rozpoczynałby syntezę dłuższego białka, a kodon AUG2 – krótszego białka. Kodon AUG1 znajduje się w słabszym kontekście oligonukleotydowym niż kodon AUG2, ale w jego sąsiedztwie tworzy się struktura „spinki do włosów,” która prawdopodobnie „zmusza” rybosom do rozpoczęcia translacji od pierwszego kodonu startowego.

UTRATA PLASTYDÓW U TRYPANOSOMATYDÓW I DALSZE LOSY ICH BIAŁEK KODOWANYCH PRZEZ GENOM JĄDROWY

Publikacje:

Bodył A., Mackiewicz P. (2008) *Were class C iron-containing superoxide dismutases of trypanosomatid parasites initially imported into a complex plastid? A hypothesis based on analyses of their N-terminal targeting signals.* **Parasitology** 135: 1101–1110.

Bodył A., Mackiewicz P., Milanowski R. (2010) *Did trypanosomatid parasites contain a eukaryotic alga-derived plastid in their evolutionary past?* **Journal of Parasitology** 96: 465–475.

Cele badań:

- analizy bioinformatyczne białek SODA i SODC trypanosomatydów pod względem ich długości, profili hydropatyczności, składu aminokwasowego oraz właściwości kierujących;
- zaproponowanie nowego modelu ewolucji białek SODC;
- wyjaśnienie rzadkości występowania w genomach trypanosomatydów genów kodujących homologii białek sinicowych, plastydowych, glonowych oraz roślinnych;
- przedstawienie nowego modelu transportu białek SODC do przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach trypanosomatydów.

Jak wspomniano wcześniej, plastydy pełnią ważne funkcje nefotosyntetyczne, co sprawia, że są one utrzymywane nie tylko przez heterotroficzne protisty, ale również przez obligatoryjne pasożyty wewnątrzkomórkowe (np. przedstawiciele Apicomplexa). Jednak, w przeciwieństwie do organizmów wolnożyjących, formy pasożytnicze otrzymują bogactwo różnych związków od swoich gospodarzy. Dlatego możliwa jest utrata plastydów u takich organizmów. Dobrym przykładem utraty plastydów jest apikompleks *Cryptosporidium parvum*, który nie posiada ani genomu plastydowego, ani plastydu (Xu i in. 2004), chociaż inne apikompleksy ciągle utrzymują apikoplast z jego genomem.

Utrata plastydów zdarzyła się prawdopodobnie również u innych obligatoryjnych pasożytów wewnątrzkomórkowych, takich jak trypanosomy i leiszmanie, które należą do rzędu Trypanosomatidae. Jednak wcześniejsi badacze nie przedstawili przekonującego dowodu na taką utratę. Na przykład Hannaert i in. opublikowali w 2003 r. drzewa filogenetyczne, na których sekwencje trypanosomatydów łączyły się z sekwencjami sinic oraz roślin. Biorąc pod uwagę bliskie pokrewieństwo ewolucyjne pomiędzy trypanosomatydami i euglenidami, autorzy ci zasugerowali, że trypanosomatydy posiadały w swojej przeszłości ewolucyjnej plastyd, który został pozyskany od zielenicy. Jednak analizy filogenetyczne Hannaert i in. (2003) były krytykowane za sztuczne grupowanie się taksonów, co wynikało ze słabej reprezentacji różnych grup organizmów fotosyntetycznych (Rogers i Keeling 2004).

W pracy z *Parasitology* (2008) przedstawiłem nowy rodzaj dowodu molekularnego na utratę plastydów u trypanosomatydów, który oparty jest na strukturze oraz ewolucji ich białek SOD typu C. Dufernez i in. opublikowali w 2006 r. pierwsze dane molekularne o dysmutazach nadtlenkowych u trypanosomatydów. Pasożyty te posiadają cztery białka Fe-SOD, z których aż dwa – SODA i SODC – dostarczane są do mitochondriów. Chociaż dysmutazy te importowane są do tego samego organellum, to jednak różnią się one istotnie pod względem długości i struktury ich presekwencji. Presekwencje białek SODA mają długość ok. 30 reszt aminokwasowych i przypominają mitochondrialne peptydy tranzytowe. W przeciwieństwie do białek SODA, presekwencje białek SODC mają długość ok. 100 reszt aminokwasowych i nie przypominają mitochondrialnych peptydów tranzytowych. Ponadto pre-sekwencje te zawierają domenę hydrofobową, która posiada cechy peptydu sygnałowego oraz domenę hydrofilową, która posiada cechy peptydu tranzytowego. Dwuczęściowa struktura presekwencji białek SODC nasunęła mi hipotezę, że były one kiedyś importowane do plastydu.

Do przetestowania tej hipotezy zostały wykorzystane analizy bioinformatyczne, które wykonał dr hab. Paweł Mackiewicz. Analizy te wykazały, że presekwencje białek SODA

mają wyraźne cechy mitochondrialnych peptydów tranzytowych, które kierują białka trypanosomatydów do matriks mitochondrialnej. Analizy bioinformatyczne presekwencji białek SODC potwierdziły moje wcześniejsze przypuszczenia o ich naturze plastydowej. Presekwencje te przypominają bardzo wyraźnie N-końcowe sekwencje kierujące białek importowanych do plastydów euglenidów i dinoflagellatów. Podobieństwa pomiędzy tymi presekwencjami dotyczą ich (1) długości; (2) profili hydrofobowości; (3) składu aminokwasowego oraz (4) właściwości kierujących.

Wyniki te zainspirowały mnie do sformułowania całkowicie nowego modelu ewolucji białek SODC. Zgodnie z moim modelem, trypanosomatidy posiadały początkowo tylko jedną dysmutazę nadtlenkową, która była importowana do mitochondrium. Przed lub po ustanowieniu plastydu, gen kodujący tę dysmutazę uległby duplikacji, dając początek białkom SODA i SODC. Obie dysmutazy byłyby początkowo kierowane do mitochondrium, ale dodanie peptydu sygnałowego do białka SODC spowodowałoby jego przekierowanie do plastydu. Utrata zdolności do fotosyntezy przez nabyty plastyd doprowadziła do gwałtownego spadku w ilości produkowanych wolnych rodników, co umożliwiło ponowne skierowanie białka SODC do plastydu. Po utracie plastydu jedynym dowodem na wcześniejsze występowanie tego organellum u trypanosomatydów stała się osobiwa długość i struktura presekwencji białek SODC.

W pracy z *Journal of Parasitology* (2010) omówiłem interesujący przypadek białek SODC w szerszym kontekście genomowym, ewolucyjnym i transportowym, proponując dodatkowo nowe hipotezy i modele. Genomy trypanosomatydów charakteryzują się rzadkością występowania homologów genów sinicowych, plastydowych, glonowych oraz roślinnych. Zaproponowałem hipotezę, zgodnie z którą – po eliminacji eukariotycznego plastydu – nastąpiła masowa utrata jego genów, a te, które pozostały, uległy tak silnej dywergencji, że ich prawidłowa identyfikacja jest obecnie praktycznie niemożliwa.

Na poparcie tej hipotezy przedstawiłem kilka argumentów. Na przykład genom apikompleksu *C. parvum* zawiera tylko kilka genów reprezentujących „odcisk” minionej endosymbiozy plastydowej, co sugeruje masową utratę genów plastydowych u tego gatunku. Na wcześniejsze występowanie apikoplastu u *C. parvum* wskazuje obecność tego organellum u większości apikompleksów oraz istnienie chromerida *Chromera velia*, który traktowany jest jako model fotosyntetycznego przodka Apicomplexa. Ponadto pośredni dowód na masową utratę genów plastydowych u trypanosomatydów pochodzi od protistów zawierających mitosomy. Mitosomy są silnie zmodyfikowanymi mitochondriami, które utraciły swoją pierwotną zdolność do syntezy ATP. Ich jedyną funkcją jest obecnie synteza centrów żelazo-siarkowych (Fe-S). Mitosomy występują np. u diplomonady *Giardia lamblia*.

Analiza jej genomu wykazała, że utracił on typowe geny mitochondrialne, a zachował jedynie geny, które związane są z syntezą centrów Fe-S.

Dwuczęściowa struktura presekwencji białek SODC wskazuje, że trypanosomatydy posiadały kiedyś plastyd, który został nabyty od glonu eukariotycznego. Biorąc pod uwagę bliski związek ewolucyjny pomiędzy trypanosomatydami i euglenidami można by przypuszczać, tak jak zrobili to [Hannaert i in. \(2003\)](#), że plastyd ten wyewoluował z zielenicy. Jednak genomy trypanosomatidów kodują desaturazę $\Delta 4$, która na drzewach filogenetycznych łączy się z haptofitami oraz heterokontami. Dlatego zaproponowałem hipotezę, zgodnie z którą pasożyty te „eksperymentowały” w swojej przeszłości ewolucyjnej z plastydem trzeciorzędowym, który został pozyskany od haptofita lub heterokonta.

W genomach trypanosomatydów zidentyfikowano homologii genów sinicowych. Geny te mogły zostać nabyte na drodze horyzontalnego transferu genów, ale mogą one też być pozostałością po plastydzie pierwotnym. Uwzględniając taką możliwość, zasugerowałem, że w ewolucji trypanosomatydów doszło do podstawienia plastydów, np. plastydu pierwotnego przez plastyd trzeciorzędowy.

Białka SODC stanowią obecnie najmocniejszy dowód na poparcie hipotezy, że trypanosomatydy posiadały kiedyś plastyd. W pracy z [Journal of Parasitology \(2010\)](#) zwróciłem uwagę, że w przypadku genów, które nie powstały przez duplikację genu gospodarza, nie możemy nigdy wykluczyć, że zostały one nabyte na drodze poziomego transferu genów. Transfer taki jest możliwy w przypadku trypanosomatydy, ponieważ niektóre gatunki (np. przedstawiciele rodzaju *Phytomonas*) są pasożytami roślin, a inne gatunki (np. *Crithidia deanei*) posiadają endosymbionty bakteryjne.

Wolne rodniki nie przechodzą łatwo przez błony, dlatego mitochondria posiadają dysmutazy w ich przestrzeni międzymbłonowej. [Dufernez i in. \(2006\)](#) zasugerowali, że białka SODC transportowane są do przestrzeni międzymbłonowej w mitochondriach trypanosomatydów. Jednak mechanizm tego transportu jest niejasny. Białka SODC mogłyby być transportowane najpierw do matriks mitochondrialnej, a następnie przechodziłyby do przestrzeni międzymbłonowej przy pomocy translokonu Sec zlokalizowanego w wewnętrznej błonie mitochondrialnej. Szlak ten był aktywny u α -proteobakteryjnego przodka mitochondriów i jest on ciągle zachowywany przez niektóre mitochondria, ale mitochondria trypanosomatydów pozbawione są translokonu Sec. Dlatego zaproponowałem nowy model transportu białek SODC do przestrzeni międzymbłonowej w mitochondriach trypanosomatydów. Zgodnie z moim modelem, dysmutazy te transportowane są najpierw kointegralnie do systemu błon wewnętrznych, a następnie zostają skierowane w pęcherzykach transportowych do zewnętrznej błony mitochondrialnej. Po fuzji pęcherzyka

transportowego z tą błoną, białka SODC byłyby uwalniane bezpośrednio do przestrzeni międzybłonowej, gdzie mogłyby pełnić swoje funkcje.

PODSUMOWANIE

Moje modele i hipotezy uzyskały już potwierdzenie w badaniach eksperymentalnych. Po pierwsze, dostępne obecnie dane jasno pokazują, że chromatofory *P. chromatophora* są organellami komórkowymi. Chromatofory importują ponad 100 różnych białek (Singer *i in.* 2017), a niektóre z nich kierowane są do tych organelli przez system błon wewnętrznych (Nowack *i Grossman* 2012).

Po drugie, mój model ewolucji systemu importu białek do plastydów pochodzenia sinicowego pozostaje w zgodzie z wynikami analiz filogenetycznych białek, które kierowane są do „zielonych” plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych (Gagat *i in.* 2013). Analizy te wykazały, że α -amylaza, anhydraza α -węglanowa oraz pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa wywodzą się z białek gospodarza, które zostały skierowane do plastydów pierwotnych dopiero u roślin wyższych.

Po trzecie, hipoteza Chromalveolata ma dzisiaj wartość już tylko historyczną. Białka GAPDH były wielokrotnie transferowane horyzontalnie, dlatego nie mogą one stanowić dowodu na prawdziwość hipotezy chromalweolatowej (Takishita *i in.* 2004). Chromista okazały się być grupą polifiletyczną (Burki *i in.* 2016), a grupą siostrzaną dla heterokontów w kladzie SAR [stramenopile (=heterokonty), alweolaty, rizarie] nie są alweolaty, ale rizarie (He *i in.* 2016). Genomy orzęsków oraz lęgniowców nie przechowały dowodu na wcześniejsze występowanie plastydu u tych protistów (Stiller *i in.* 2009). Zgodnie z analizami z analizami statystycznymi Stillera *i in.* (2014), plastydy eukariotyczne pochodzenia krasnorostowego były pozyskiwane przez heterotroficzne protisty na drodze trzeciorzędowych endosymbioz.

Po czwarte, pośrednie wsparcie otrzymał również mój model ewolucji białek SODC u trypanosomatydów. Apikopleksy posiadają dysmutazę żelazową z charakterystyczną dwuczęściową presekwencją plastydową, która zapewnia jej kierowanie zarówno do plastydu, jak i mitochondrium (Pino *i in.* 2007). Ponadto na drzewach filogenetycznych białek Fe-SOD grupą siostrzaną dla kladu składającego się z białek SODC i SODA są białka ekskawatów (takich jak trichomonady), co wskazuje, że białka SODC były dziedziczone wertykalnie, a nie horyzontalnie (Dufernez *i in.* 2006), tak jak przewiduje to mój model.

Obecnie przygotowuję trzy prace, które zostaną wysłane do czasopism o wysokim współczynniku impact factor. W najbliższym czasie złożę również projekt grantu. Wcześniej

publikowanie moich prac w dobrych czasopismach zapewniało mi finansowanie moich badań teoretyczno-bioinformatycznych na odpowiednim poziomie w ramach badań własnych oraz statutowych. Nawiążę także ścisłą współpracę z firmą bioinformatyczną oraz laboratorium zajmującym się biologią molekularną komórki. Przeprowadziłem już wstępne rozmowy z firmą Bioidea z Warszawy oraz prof. dr hab. Robertem Wysockim, który jest kierownikiem Zakładu Genetyki i Fizjologii Komórki na Wydziale Nauk Biologicznych Uniwersytetu Wrocławskiego. Dlatego patrzę optymistycznie na mój dalszy rozwój naukowy.

5. OMÓWIENIE POZOSTAŁYCH OSIĄGNIĘĆ NAUKOWO-BADAWCZYCH

Publikacje przed doktoratem

Transport aktywny przez plazmalemmę komórek roślinnych

Publikacja:

Bodył A. (1993) *Mechanizm transport aktywnego przez plazmalemmę komórek roślinnych.* *Kosmos* 42: 565–582.

Praca z *Kosmosu* (1993) stanowi przegląd różnych zagadnień związanych z transportem aktywnym przez plazmalemmę komórek roślinnych. Inspiracją do jej napisania stała się moja praca magisterska, w której badałem wpływ różnych inhibitorów metabolicznych na transport jonów NH_4^+ przez plazmalemmę komórek *Pisum arvense*.

Zgodnie z teorią chemiosmotyczną, w poprzek plazmalemmy komórek roślinnych tworzy się gradient elektrochemiczny protonów (tzw. transport pierwotny), który jest następnie zużywany w transporcie aktywnym różnych związków (tzw. transport wtórny). Kluczową rolę w tym procesie pełnią pompy protonowe, takie jak H^+ -ATP-aza. W pracy z *Kosmosu* (1993) zawarłem szczegółowe dane o transporcie pierwotnym, transporcie wtórnym, a także strukturze, aktywności oraz ewolucji H^+ -ATP-azy. Ponadto scharakteryzowałem rolę oksydoreduktaz plazmalemmowych w tworzeniu się gradientu protonów.

Dziedziczenie cech nabytych

Publikacja:

Bodył A. (1994) *Czy Lamarck miał rację? Kilka uwag o dziedziczeniu cech nabytych.* *Kosmos* 43: 213–229.

W 1993 r. ukazał się w *Świecie Nauki* krótki esej poświęcony dziedziczeniu cech nabytych. Autor tego eseju, E.O. Landman, przedstawił szereg systemów takiego dziedziczenia u współczesnych organizmów. Badacz ten zasugerował, że horyzontalne transfery genów oraz mitochondrialne i plastydowe endosymbiozy są przykładami dziedziczenia cech nabytych.

Publikacja tego eseju stała się dla mnie bezpośrednią inspiracją do napisania pracy polemicznej, która ukazała się w *Kosmosie* (1994). W pracy tej scharakteryzowałem teorię Lamarcka, zwracając uwagę że dziedziczenie cech nabytych miało drugorzędne znaczenie w jego teorii. Ponadto wykazałem, że podane przykłady dziedziczenia cech nabytych pasują bardzo dobrze do teorii Darwina. Zaproponowałem także, że poziome transfery genów oraz endosymbiozy zwiększają ilość DNA w komórkach, co jest następnie testowane przez dobór naturalny. Prawdziwie neolamarckistowska teoria powinna postulować zmienność kierunkową, ale obecnie nie mamy dowodu na istnienie takiej zmienności. Z punktu widzenia historii nauki, hipoteza dziedziczenia cech nabytych jest interesującym przykładem powracających idei ewolucyjnych.

Pochodzenie ewolucyjne nefotosyntetycznej eugleniny Euglena (wcześniej Astasia) longa

Publikacje:

Bodył A. (1996) *Is the origin of Astasia longa an example of the inheritance of acquired characteristics?* *Acta Protozoologica* 35: 87–94.

Niefotosyntetyczna euglenina *Euglena* (wcześniej *Astasia*) *longa* przypomina bardzo wyraźnie fotosyntetyczną eugleninę *Euglena gracilis*. Zgodnie z jedną z hipotez, komórki *E. longa* powstają z komórek *E. gracilis* w procesie indukowanego blaknięcia pod wpływem czynników, takich jak antybiotyki, podwyższona temperatura, promieniowanie UV oraz antyhistaminy. Zakłada się, że indukowane blaknięcie prowadzi do degeneracji nie tylko DNA plastydowego (ptDNA), ale również plastydów. Ponadto indukowane blaknięcie komórek *E. gracilis* traktowane jest jako przykład dziedziczenia cech nabytych.

W pracy z *Acta Protozoologica* (1996) przedstawiłem szereg argumentów przeciw hipotezie, że komórki *E. longa* powstają z komórek *E. gracilis* w następstwie indukowanego blaknięcia. Po pierwsze, istnieją różnice ultrastrukturalne pomiędzy komórkami *E. longa* a komórkami wyblakniętych szczepów *E. gracilis*. Po drugie, *E. longa* posiada ptDNA, co wskazuje, że występuje u niej również plastyd. Po trzecie, ptDNA wyblakniętych

szczepów *E. gracilis* różni się bardzo wyraźnie od ptDNA *E. longa*. W pracy tej zaproponowałem również nowy model ewolucji ptDNA *E. longa*, który pozostaje w wyraźnej sprzeczności z hipotezą indukowanego blaknięcia. Ponadto sformułowałem szereg argumentów wskazujących, że *E. longa* zachowała plastyd. Hipotezy i argumenty, które zawarłem w pracy z *Acta Protozoologica* (1996), poddają w wątpliwość ideę dziedziczenia cech nabytych.

Publikacje po doktoracie

Teoria endosymbiotyczna

Publikacje:

Bodył A., Mackiewicz P. (2013) *Endosymbiotic Theory*. In: Maloy S., Hughes K. (ed.) **Brenner's Encyclopedia of Genetics**, vol. 2. New York: Elsevier, s. 484–492.

Bodył A., Mackiewicz P., Cieśla J. (2017) *Endosymbiotic theory: models and challenges*. In: **Reference Module in Life Sciences**, Elsevier, s. 1–11.

Prestiżowe wydawnictwo Elsevier zwróciło się do mnie dwa razy z prośbą o opracowanie rozdziału poświęconego teorii endosymbiotycznej. Pierwszy rozdział ukazał się w *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2013), a drugi w *Reference Module in Life Sciences* (2017). Oba rozdziały zawierają przegląd różnych zagadnień związanych nie tylko z ewolucją mitochondriów i plastydów, ale również z ewolucją komórki eukariotycznej. W rozdziałach tych omówiłem problemy, takie jak (1) modele symbiotycznego i niesymbiotycznego powstania komórki eukariotycznej; (2) hipotezę Archezoa; (3) model wodorowy; (4) transformacje endosymbionta w organellum; (5) chromatofory *Paulinella chromatophora*; (6) endosymbionty bakteryjne z rodzaju *Buchnera*; (7) modyfikacje, redukcje oraz utraty mitochondriów i plastydów oraz (8) pochodzenie wici, peroksosomów i jądra komórkowego.

Transfery horyzontalne plastydów chromalweolatowych

Publikacja:

Bodył A., Stiller J.W., Mackiewicz P. (2009) *Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses?* **Trends in Ecology and Evolution** 24: 119–121.

Jak wspomniano wcześniej, hipoteza Chromalveolata postuluje, że wspólny przodek Chromista i Alveolata pochłoniął krasnorost, który uległ następnie transformacji w złożony plastyd z czterema błonami otoczkowymi, posiadający dodatkowo kompartment periplastydowy z nukleomorfem. Jednak hipoteza ta napotyka na szereg trudności, które sugerują, że plastydy chromistowe i alweolatowe wyewoluowały w inny sposób niż sugeruje to hipoteza chromalweolatowa.

Praca z *Trends in Ecology and Evolution* (2009) zawiera nowy model ewolucji plastydów chromalweolatowych. Zaproponowałem, że wtórne pochodzenie krasnorostowe ma tylko plastyd kryptofitowy. Wszystkie pozostałe plastydy chromistowe i alweolatowe wyewoluowałyby w wyniku seryjnych endosymbioz trzeciorzędowych. Założyłem, że istniały dwa główne szlaki transferu tych plastydów. Pierwszy szlak to: kryptofity → haptofity → bruzdnice peridininowe oraz drugi szlak: kryptofity → heterokonty → *Chromera*. Źródło apikoplastu nie było jeszcze jasne w 2009 r., dlatego rozważałem zarówno krasnorostowe, jaki i zielenicowe pochodzenie tego plastydu.

Teoria kompartmentacji Schnepfa a pochodzenie plastydów trójbłonowych bruzdnic i euglenidów

Publikacja:

Bodył A. (2017) *How to lose the plasmalemma? Lessons from ciliates, dinoflagellates and euglenids*. *BioEssays* 39: doi: 10.1002/bies.201700149.

Praca z *BioEssays* (2017) stanowi polemikę z poglądami zawartymi w artykule **Mooga i Maiera** (2017), który ukazał się wcześniej w tym samym czasopiśmie. Artykuł tych autorów poświęcony jest teorii kompartmentacji Schnepfa, która postuluje, że błony biologiczne oddzielają fazy plazmatyczne od faz nieplazmatycznych. Wyzwanie dla teorii Schnepfa stanowią plastydy trójbłonne bruzdnic oraz euglenidów z ich błoną środkową, która oddziela dwie fazy nieplazmatyczne.

W mojej pracy z *BioEssays* (2017) skupiłem się na kilku zagadnieniach. Po pierwsze, ślimak morski *Elysia timida* nie jest dobrym modelem do testowania hipotez o myzocytotycznym i kleptoplastydowym pochodzeniu plastydów trójbłonowych bruzdnic oraz euglenidów, ponieważ nie odżywia się on na drodze myzocytozy. Ponadto *E. timida* pobiera z komórek zielenicy *Acetabularia acetabulum* tylko plastydy bez ich jąder kodujących setki białek plastydowych. Po drugie, bardzo zróżnicowane systemy kleptoplastydowe wyewoluowały u licznych protistów. Szczególnie ciekawym przypadkiem jest orzęsek

Mesodinium rubrum, który „wydobywa” z komórek kryptofitów nie tylko plastydy, ale również jądra. Organelle te umieszczane są w oddzielnych kompartmentach, a każdy z nich otoczony jest przez pojedynczą błonę symbiosomalną. Po trzecie, *M. rubrum* stanowi kolejne wyzwanie dla teorii Schnepfa, ponieważ błony symbiosomalne, otaczające kleptoplastydy i kleptokariony, oddzielają dwie fazy plazmatyczne. Po czwarte, morska euglenida *Rapaza viridis* dostarcza model utraty plazmalemmy przez zielenicowego przodka plastydu euglenidowego. Gatunek ten pochłania poprzez fagocytozę specyficzny szczep zielenicy *Tetraselmis* sp. „Połknięte” komórki *Tetraselmis* umieszczane są w centralnym fagosomie, gdzie ich plazmalemma zostaje strawiona, a uwolnione plastydy przekazywane są następnie do specjalnych pęcherzyków, które zabezpieczają je przed strawieniem.

Białka kierowane do plastydów roślin wyższych przez system błon wewnętrznych

Publikacja:

Gagat P., **Bodył A.**, Mackiewicz P. (2013) *How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. Biology Direct* 8: 18.

Zgodnie z wcześniejszymi rozważaniami, u roślin wyższych istnieje niewielka grupa białek plastydowych, które kierowane są do plastydów przez system błon wewnętrznych i noszą peptydy sygnałowe. Białkami tymi są α -amylazy (takie jak Amy3 i Amy7), anhidraza α -węglanowa oraz pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa. Ponadto u zielenicy *Chlamydomonas reinhardtii* znaleziono izomerazę disiarczkową, która transportowana jest post-translacyjnie do plastydów i ko-translacyjnie do ER.

Nasze analizy filogenetyczne każdego z tych białek – które zostały opublikowane w *Biology Direct* (2013) – wykazały, że żadne z nich nie ma pochodzenia sinicowego. Tym samym białka te trudno traktować jako „relikt” wczesnego importu białek do plastydów pierwotnych przez system błon wewnętrznych, tak jak postuluje to hipoteza [Bhattacharya i in. \(2007\)](#). Na otrzymanych drzewach filogenetycznych, α -amylazy, anhidraza α -węglanowa, pyrofosfataza/fosfodiesteraza nukleotydowa oraz izomeraza disiarczkowa łączyły się z białkami eukariotycznymi wyposażonymi w peptydy sygnałowe. To wskazuje, że niewielka grupa białek gospodarza, które były wcześniej kierowane do jego systemu błon wewnętrznych, została przekierowana do plastydów pierwotnych. Osobliwy import białek do tych plastydów przez system błon wewnętrznych wyewoluował najprawdopo-

dobniej dawno po ustanowieniu endosymbiozy pierwotnej, przypuszczalnie dopiero u roślin wyższych.

Sygnaty kierujące białka do chromatoforów Paulinella chromatophora oraz implikacje endosymbiozy chromatoforowej dla ewolucji fotosyntetycznych organelli komórkowych

Publikacje:

Mackiewicz P., **Bodył A.** (2010) *A hypothesis for import of the nuclear-encoded PsaE protein of Paulinella chromatophora (Cercozoa, Rhizaria) into its cyanobacterial endosymbionts/plastids via the endomembrane system.* **Journal of Phycology** 46: 847–859.

Mackiewicz P., **Bodył A.**, Gagat P. (2012) *Possible import routes of proteins into the cyanobacterial endosymbionts/plastids of Paulinella chromatophora.* **Theory in Biosciences** 131: 1–18.

Mackiewicz P., **Bodył A.**, Gagat P. (2012) *Protein import into the photosynthetic organelles of Paulinella chromatophora and its implications for primary plastid endosymbiosis.* **Symbiosis** 58: 99–107.

Bodył A., Mackiewicz P., Gagat P. (2012) *Organelle evolution: Paulinella breaks a paradigm.* **Current Biology** 22: R304–R306.

Gagat P., **Bodył A.**, Mackiewicz P. (2016) *Breaking the endosymbiont-organelle border: the case of Paulinella chromatophora.* **Endocytobiosis and Cell Research** 27: 45–51.

Bodył A., Cieśla J., Mackiewicz P., Gagat P. (2017) *Cyanobacterial endosymbionts of Paulinella chromatophora shed new light on the birth of cellular organelles.* In: Grube M., Seckbach J., Muggia L. (ed.) **Algal and Cyanobacteria Symbioses**. London: World Scientific Publishing Europe, s. 279–328.

Jak wspomniano wcześniej, ameba skorupkowa *Paulinella chromatophora* posiada osobliwe organelle fotosyntetyczne znane jako chromatofory. Organelle te przypominają sinice, z których wyewoluowały one niezależnie od plastydów pierwotnych glaukofitów, krasnorostów oraz roślin zielonych. Chromatofory otoczone są przez dwie błony i ciągle utrzymują peptydoglikan pomiędzy ich błonami otoczkowymi.

W pracy z *Journal of Phycology* (2010) wykazaliśmy, że białko PsaE u *P. chromatophora* posiada N-końcowy peptyd sygnałowy. To wskazuje, że białko to kierowane jest do chromatoforów przez system błon wewnętrznych. Po fuzji pęcherzyka transportowego z zewnętrzną błoną chromatoforową, białko PsaE byłoby uwalnianie do przestrzeni międzybłonowej, skąd musiałoby ono przechodzić nie tylko przez wewnętrzną błonę chromatoforową, ale również peptydoglikan przed dostaniem się do matriks chromatoforu. W pracy tej przedstawiłem hipotezy oraz modele, które tłumaczą te etapy transportu. Omówiłem również pochodzenie zewnętrznej błony chromatoforowej.

Rysunek 4 z tej pracy znalazł się na okładce wydania październikowego *Journal of Phycology* w 2010 r.

Praca z *Theory in Biosciences* (2012) zawiera wyniki szczegółowych analiz bioinformatycznych 10 białek chromatoforowych, które kodowane są przez genom jądrowy *P. chromatophora*. Analizy te wykazały, że (1) białka importowane do chromatoforów wyposażone są nie tylko w peptydy sygnałowe, ale również w presekwencje przypominające mitochondrialne peptydy tranzytowe; (2) że część peptydów sygnałowych i mitochondrialne peptydy tranzytowe zostały dodane do oryginalnych białek sinicowych; (3) że część peptydów sygnałowych wyewoluowała z hydrofobowych regionów w oryginalnych białkach sinicowych poprzez zmiany w ich składzie aminokwasowym; (4) że niektóre białka chromatoforowe wydają się być pozbawione N-końcowych sekwencji kierujących oraz (5) że białka importowane do chromatoforów mają niski ciężar cząsteczkowy i prawie obojętny ładunek. Otrzymane wyniki wskazują, że istnieje kilka mechanizmów importu białek do chromatoforów i że ich presekwencje wyewoluowały na różnych drogach. Brak N-końcowych sekwencji kierujących w niektórych białkach chromatoforowych może wynikać z niedawnego transferu ich genów do genomu jądrowego *P. chromatophora*. Pozostałe białka chromatoforowe bez presekwencji mogą zawierać wewnętrzne lub C-końcowe sygnały kierujące. Istotną barierą w imporcie białek do chromatoforów wydaje się być peptydoglikan, który zachowuje się jak sito molekularne z licznymi grupami anionowymi. Cechy te tłumaczyłyby niski ciężar cząsteczkowy i prawie obojętny ładunek białek importowanych do chromatoforów.

Praca z *Symbiosis* (2012) stanowi przegląd różnych zagadnień dotyczących importu białek do chromatoforów. Ponadto zawiera nowy model motoru molekularnego, który prawdopodobnie występuje w wewnętrznej błonie chromatoforowej i umożliwia translokację importowanych białek do matriks chromatoforu. Motor ten byłby oparty na trzech białkach: Hsp70, Hsp40 oraz GrpE.

Current Biology zwróciło się do mnie w 2012 r. z prośbą o napisanie krótkiej pracy poświęconej *P. chromatophora* i jej chromatoforom. Plastydy pierwotne glaukofitów, krasnorostów i roślin zielonych traktowane są zwykle jako dowód na unikalność transformacji sinic w organelle, ale *P. chromatophora* łamie ten paradygmat, co omówiłem w tej pracy. Problem częstotliwości transformacji endosymbionta w organelum jest również rozważany w pracy z *Endocytobiosis and Cell Research* (2016).

Wydawnictwo World Scientific Publishing zwróciło się do mnie z prośbą o opracowanie rozdziału poświęconego *P. chromatophora* do książki „*Algal and Cyanobacteria Symbioses*”, która ukazała się w 2017 r. Rozdział ten stanowi bardzo obszerny przegląd różnych zagadnień dotyczących tej osobliwej ameby i jej chromatoforów. Omówiłem w nim następujące zagadnienia: (1) pochodzenie plastydów pierwotnych i ich systemów importu białek; (2) proces transformacji endosymbionta w organelum; (3) miejsce *P. chromatophora* na drzewie filogenetycznym eukariontów; (4) sinicowy przodek chromatoforów; (5) liczba fotosyntetycznych gatunków w rodzaju *Paulinella*; (6) natura organello-wa chromatoforów; (7) homologia błon chromatoforowych; (8) import białek do chromatoforów; (9) *P. ovalis* as model heterotroficznego przodka *P. chromatophora* oraz (10) liczba pomyślnych transformacji endosymbiontów bakteryjnych w organelle komórkowe.

„Niezwykłe” plastydy pochodzenia trzeciorzędowego u bruzdnic

Publikacja:

Gagat P., **Bodył A.**, Mackiewicz P., Stiller J.W. (2014) *Tertiary plastid endosymbioses in dinoflagellates*. In: Löffelhardt W. (ed.) *Endosymbiosis*. Wien: Springer Verlag, s. 233–290.

Bruzdnic są prawdziwymi „ekspertami” w nabywaniu plastydów. Zdecydowana większość ich fotosyntetycznych gatunków posiada plastyd peridininowy, ale w niektórych liniach filogenetycznych plastyd ten został podstawiony przez bardzo zróżnicowane struktury fotosyntetyczne znane jako „niezwykłe” plastydy. Struktury te reprezentowane są przez kleptoplastydy, stałe endosymbionty oraz plastydy. „Niezwykłe” plastydy włączane są regularnie lub zostały już włączone do komórek bruzdnic na drodze wtórnych i trzeciorzędowych endosymbioz.

Wydawnictwo Springer zwróciło się do mnie z prośbą o przygotowanie rozdziału poświęconego plastydom eukariotycznym do książki „*Endosymbiosis*” (2014). W książce tej opublikowaliśmy rozdział o „niezwykłych” plastydach pochodzenia trzeciorzędowego u

bruzdnic. Skoncentrowaliśmy się na trzech rodzajach struktur fotosyntetycznych: (1) kleptoplastydach pochodzenia kryptofitowego u *Dinophysis*; (2) stałych endosymbiontach wywodzących się z okrzemek u *Kryptoperidinium* i *Durinskia* oraz (3) plastydach pochodzenia haptofitowego u *Karenia*, *Karlodinium* oraz *Takayama*. Rozdział z „*Endosymbiosis*” (2014) stanowi obszerny przegląd różnych zagadnień dotyczących tych trzech rodzajów „niezwykłych” plastydów u bruzdnic, takich jak (1) sposoby ich pozyskiwania; (2) ultrastruktura; (3) transfer genów do genomu jądrowego gospodarza; (4) szlaki importu białek kodowanych przez genom jądrowy; (5) pochodzenie ewolucyjne oraz (6) mechanizmy podstawienia plastydu peridininowego. Ponadto w rozdziale tym zaproponowałem kilka nowych hipotez, np. homologię błon w kleptoplastydach *Dinophysis* oraz import białek do stałych endosymbiontów *Kryptoperidinium* i *Durinskia*.

Transfer genów do osobliwego genomu „minikółkowego” plastydu peridininowego

Publikacje:

Moszczyński K., Mackiewicz P., **Bodył A.** (2012) *Evidence for horizontal gene transfer from bacteroidetes bacteria to dinoflagellate minicircles. Molecular Biology and Evolution* 29: 887–92.

Mackiewicz P., **Bodył A.**, Moszczyński K. (2013) *The case of horizontal gene transfer from bacteria to the peculiar dinoflagellate plastid genome. Mobile Genetic Elements* 3: e25845.

Jedną z osobliwych cech plastydu peridininowego, który występuje u bruzdnic, jest struktura jego genomu. Genom ten składa się z licznych małych, kolistych cząsteczek DNA, które przypominają plazmidy i zostały nazwane minikółkami. Struktury te mają wielkość 0,4–10 kb i kodują 0–5 genów.

W pracach z *Molecular Biology and Evolution* (2012) oraz *Mobile Genetic Elements* (2013) wykazaliśmy, że niektóre minikółka posiadają geny, które grupują się na drzewach filogenetycznych z sekwencjami bakterii *Algoriphagus* i *Cytophaga* należących do kladu Bacteroidetes. Wyniki te wskazują na horyzontalny transfer genów od bakterii Bacteroidetes do genomu minikółkowego plastydu peridininowego. Jest to pierwszy, udokumentowany przykład transferu genów do tego osobliwego genomu plastydowego.

Zgodnie z akceptowaną powszechnie hipotezą, genom minikółkowy plastydu peridininowego powstał z typowego genomu plastydowego poprzez jego redukcję i fragmentację. Jednak nasze badania sugerują jego znacznie bardziej złożoną ewolucję. Jest możli-

we, że ewolucja tego osobliwego genomu polegała również na transferze całych minikótek od bakterii.

Niefotosyntetyczny plastyd występujący u przedstawicieli Apicomplexa

Publikacje:

Bodył A. (1999) *How are plastid proteins of the apicomplexan parasites imported? A hypothesis.* **Acta Protozoologica** 38: 31–37.

Bodył A. (1999) *How have apicomplexan plastids evolved? A hypothesis.* In: Wagner E. i in. (ed.) **From Symbiosis to Eukaryotism**. Geneva: University of Geneva, p. 327–340.

Bodył A. (1999) *Evolutionary pathway of the apicomplexan plastids and its implications.* **Trends in Microbiology** 7: 266–267.

Jak wspomniano wcześniej, pasożytnicze protisty należące do gromady Apicomplexa posiadają niefotosyntetyczny plastyd znany jako apikoplast. Plastyd ten otoczony jest przez cztery błony, co jasno pokazuje, że wyewoluował on na drodze wtórnej lub trzeciorzędowej endosymbiozy. Apikoplast pełni bardzo ważne funkcje metaboliczne, takie jak biosynteza hemu, kwasów tłuszczowych i izoprenoidów, dlatego jest on doskonałym celem w terapii różnych chorób wywoływanych przez apikopleksy, np. malarii czy toksoplazmozy.

W pracy z *Acta Protozoologica* (1999) jako pierwszy zaproponowałem model importu białek do apikoplastu. Zgodnie z moim modelem, białka kierowane są do tego osobliwego plastydu przez system błon wewnętrznych i noszą dwuczęściowe presekwencje składające się z peptydu sygnałowego oraz peptydu tranzytowego. Model ten ma ważne implikacje praktyczne. Na przykład skuteczne zablokowanie fuzji pęcherzyków transportowych – wywodzących się z systemu błon wewnętrznych i zawierających enzymy ważne metabolicznie – z najbardziej zewnętrzną błoną apikoplastową uniemożliwiłoby jego biogenezę, co mogłoby znaleźć praktyczne zastosowanie w terapii malarii i toksoplazmozy. Celem w tej terapii byłyby białka SNARE oraz inne białka odpowiedzialne za fuzję pęcherzyków transportowych z najbardziej zewnętrzną błoną apikoplastową.

W rozdziale z książki „*From Symbiosis to Eukaryotism*” (1999) przedstawiłem nowy model ewolucji apikoplastu, zgodnie z którym plastyd ten wyewoluował przez podstawienie plastydu peridininowego. Inspiracją do jego sformułowania stał się bliski związek ewo-

lucyjny pomiędzy apikopleksami i bruzdnicami. Bruzdnice zawierają nie tylko plastyd peridininowy, ale również „niezwykłe” plastyny, które zostały nabyte od różnych glonów. Na przykład „niezwykły” plastyd pochodzenia zielenicowego występuje u bruzdnic z rodzaju *Lepidodinium*. Dostępne obecnie dane wskazują, że apikoplast ma pochodzenie krasnorostowe, ale wcześniejsze analizy filogenetyczne – opublikowane w „Science” – wskazywały, że jego przodkiem była zielenica. Dlatego zasugerowałem, że modelem ewolucji apikoplastu może być bruzdnica *Lepidodinium viride*, której plastyd zielenicowy wyewoluował przez podstawienie plastynu peridininowego.

Praca z *Trends in Microbiology* (1999) stanowi rozwinięcie idei zawartych w artykule L. Margulis i M.J. Chapmana, który ukazał się wcześniej w tym czasopiśmie. W pracy tej scharakteryzowałem moje wcześniejsze hipotezy – opublikowane w *Acta Protozoologica* (1999) oraz książce „*From Symbiosis to Eukaryotism*” (1999) – o imporcie białek do apikoplastu oraz jego szlaku ewolucyjnym.

Transport białek przez błonę periplastydową w plastynach czterobłonowych pochodzenia krasnorostowego

Publikacje:

Bodył A. (2002) *Is protein import into plastids with four-membrane envelopes dependent on two Toc systems operating in tandem?* **Plant Biology** 4: 423–431.

Bodył A. (2004) *Evolutionary origin of a pre-protein translocase in the periplastid membrane of complex plastids: a hypothesis.* **Plant Biology** 6: 513–518.

Zgodnie z wcześniejszymi rozważaniami, plastyny czterobłonne pochodzenia krasnorostowego występują u kryptofitów, heterokontów (=starmenopile), haptofitów, apikopleksów, chromeridów oraz perkinsidów. Przyjmuje się, że ich otoczka plastynowa (odpowiadająca plastynowi krasnorostu) posiada translokony Toc i Tic, a ich najbardziej zewnętrzna błona (odpowiadająca błonie fagosomalnej gospodarza) – translokon Sec. Jednak model pojedynczych translokonów Toc i Tic oraz pojedynczego translokonu Sec nie może wytłumaczyć transportu białek przez błonę trzecią, znaną jako błona periplastydowa, która wywodzi się z plazmalemy krasnorostu. Cavalier-Smith zaproponował w 1999 r., że błona ta zawiera tunel Toc75, który został tu relokowany z otoczki plastynowej przy pomocy pęcherzyków transportowych wywodzących się z jej błony zewnętrznej.

W pracy z *Plant Biology* z 2002 r. jako pierwszy zwróciłem uwagę na poważne trudności, na jakie napotyka model dwóch translokonów Toc. Po pierwsze, fuzja pęcherzyków odpączkowujących od błony zewnętrznej otoczki plastydowej z błoną periplastydową spowodowałaby włączenie tunelu Toc75 w odwrotnej topologii niż topologia postulowana przez model Cavaliera-Smitha. Tym samym importowane białka plastydowe i periplastydowe nie mogłyby przechodzić przez błonę periplastydową, a białka kodowane przez jądro endosymbionta „uciekałyby” do systemu błon wewnętrznych gospodarza. Po drugie, prekursor białka Toc75 nosi złożoną presekwencję, która składa się z peptydu tranzytowego oraz regionu hydrofobowego zaczepiającego białko w błonie. To oznacza, że relokacji białka Toc75 musiałby towarzyszyć transfer dwóch peptydaz, odcinających dwie różne sekwencje kierujące tego białka. Jednak taki jednoczesny transfer trzech różnych białek, połączony z nabyciem przez nie peptydów sygnałowych, byłby praktycznie niemożliwy.

W pracy tej zasugerowałem także gradualistyczną ewolucję złożonego systemu importu białek do plastydów czterobłonowych pochodzenia krasnorostowego. Podczas pierwotnej endosymbiozy powstałyby plastydy dwubłonowe z translokonami Toc i Tic w ich błonach otoczkowych. Podczas pierwszej rundy wtórnych endosymbioz powstałyby plastydy trójbłonowe z nowym translokonom Sec w ich najbardziej zewnętrznej błonie. Podczas drugiej rundy wtórnych endosymbioz powstałyby plastydy czterobłonowe z nowym systemem transportu w ich błonie periplastydowej.

Biorąc pod uwagę trudności napotymane przez model dwóch translokonów Toc, zaproponowałem w pracy z *Plant Biology* z 2004 r., że do błony periplastydowej w plastydach czterobłonowych pochodzenia krasnorostowego został relokowany mitochondrialny tunel Tim23. Białko to posiada wewnętrzną sekwencję kierującą, co oznacza, że jego relokacji nie musiałby towarzyszyć transfer peptydaz odcinających dwie całkowicie różne N-końcowe sekwencje kierujące. W moim modelu endosymbiont krasnorostowy posiadał początkowo nie tylko plastyd, ale również mitochondrium. Dlatego zasugerowałem, że relokowany tunel Tim23 uczestniczył w transporcie zarówno białek plastydowych, jak i białek mitochondrialnych. Założenie to umożliwia zrozumienie, jak wyewoluował import białek do kompartmentu periplastydowego. Po utracie mitochondrium, białka mitochondrialne byłyby dostarczane do kompartmentu periplastydowego, zapoczątkowując stały import białek do tego kompartmentu.

Import białek do plastydów chlorarachniofitów a ewolucja plastydów czterobłonowych przez podstawienie plastydów

Publikacja:

Bodył A. (1997) *Mechanism of protein targeting to the chlorarachniophyte plastids and the evolution of complex plastids with four membranes – a hypothesis. Botanica Acta* 110: 395–400.

Chlorarachniofity są niewielką grupą fotosyntetycznych ameb, które należą do supergrupy Rhizaria. Plastydy tych glonów wyewoluowały z zielenicy i są one otoczone przez cztery błony. Ponadto zachowały one kompartment periplastydowy z nukleomorfem.

W pracy z *Botanica Acta* (1997) jako pierwszy zaproponowałem model importu białek do plastydów chlorarachniofitów. Zgodnie z moim modelem, białka kierowane są do tych plastydów przez system błon wewnętrznych i noszą dwuczęściowe presekwencje złożone z peptydu sygnałowego oraz peptydu tranzytowego.

Praca ta zawiera również nową wersję modelu podstawienia plastydów podczas ewolucji plastydów pochodzenia eukariotycznego. Model podstawieniowy w swojej pierwotnej wersji – zasugerowanej przez Häuber i in. (1994) – postulował, że plastydy czterobłonowe wyewoluowały przez podstawienie plastydów pierwotnych z dwoma błonami otoczkowymi. Jednak plastydy dwubłonowe i plastydy czterobłonowe korzystają z całkowicie różnych mechanizmów importu białek kodowanych przez ich genomy jądrowe. Dlatego zaproponowałem, że plastydy czterobłonowe wyewoluowały przez podstawienie plastydów pierwotnych z trzema błonami otoczkowymi. Uważano wówczas, że plastydy trójbłonowe euglenidów i bruzdnic mogą mieć pochodzenie sinicowe. Tak jak w przypadku plastydów czterobłonowych, białka kierowane są do plastydów trójbłonowych przez system błon wewnętrznych i są one wyposażone w dwuczęściowe presekwencje składające się z peptydu sygnałowego oraz peptydu tranzytowego. Zaproponowany przeze mnie model ewolucji plastydów czterobłonowych umożliwia wy tłumaczenie polifiletyzmu tych plastydów.

W pracy z *Botanica Acta* (1997) zaproponowałem również model przekierowywania białek – transportowanych początkowo do plastydu trójbłonowego – do plastydu czterobłonowego, który oparty jest na zmianach w białkach SNARE.

Genomy nukleomorfowe

Publikacja:

Mackiewicz P., **Bodył A.**, Gagat P. (2013) *Nucleomorph Genomes*. In: Maloy S., Hughes K. (ed.) *Brenner's Encyclopedia of Genetics*, vol. 5. New York: Elsevier, p. 128–133.

Zgodnie z wcześniejszymi rozważaniami, plastydy kryptofitowe i chlorarachniofitowe zachowały jądra ich glonowych przodków w postaci nukleomorfów. W przypadku kryptofitów jest to jądro krasnorostu, a w przypadku chlorarachniofitów – jądro zielenicy. Rozdział z *Brenner's Encyclopedia of Genetics* (2013) stanowi przegląd różnych zagadnień związanych z genomami nukleomorfowymi, takich jak (1) odkrycie tych genomów; (2) ich struktura, organizacja i ewolucja oraz (3) kodowane przez nie białka plastydowe. W rozdziale tym omówiłem również hipotezy, które tłumaczą utrzymywanie się nukleomorfów tylko u kryptofitów i chlorarachniofitów.

Genomy protistów

Publikacja:

Mackiewicz P., Gagat P., **Bodył A.** (2010) Genomika protistów – bardzo zróżnicowanych, ale słabo poznanych eukariotów. *Biotechnologia* 91: 91–130.

Praca z *Biotechnologia* (2010) zawiera obszerną charakterystykę genomów protistów, które zostały zsekwencjonowane do początku 2010 r. W pracy tej omówiliśmy następujące genomy: (1) gatunków pasożytniczych (protisty pozbawione typowych mitochondriów, apikompleksy, świdrowce, *Phytophthora*); (2) gatunków ważnych ekologicznie (pikoeukarioty *Micromonas* i *Ostreococcus*, okrzemki); (3) modelowych gatunków glonów (zielenica *Chlamydomonas reinhardtii*, krasnorost *Cyanidoschyzon merolae*) oraz (4) gatunków wysoko uorganizowanych (orzęski, ameba *Dictyostelium discoideum*, choanoflagellat *Monosiga brevicollis*). Praca ta zawiera również informacje o rozpoczętych i przyszłych projektach sekwencjonowania genomów protistów. Ponadto omówiliśmy w niej współczesne drzewo filogenetyczne eukariotów z jego supergrupami oraz znaczenie genomów protistów dla dokładnej rekonstrukcji tego drzewa.

Ewolucja komórek roślinnych

Publikacja:

Bodył A., Zagórska-Marek B. (2014) Letter from the Editors. *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* 83: 259–261.

Artykuł z *Acta Societatis Botanicorum Poloniae* stanowi wstęp do zeszytu tematycznego zatytułowanego „Evolution of plant cells”, który ukazał się w 2014 r. w tym czasopiśmie. Zeszyt ten zawiera 19 prac, które napisali badacze, tacy jak William F. Martin, Karl

J. Niklas, Zofia Szweykowska-Kulińska, Sven B. Gould, Eva C.M. Nowack, Christopher E. Lane, Marek Eliáš, Philippe Deschamps, Maria Virginia Sanchez-Puerta, Eunsoo Kim. Poniżej podaję tytuły wybranych prac:

(1) *Plastid origin: who, when and why?*; (2) *Primary endosymbiosis: have cyanobacteria and Chlamydiae ever been roommates?*; (3) *Involvement of plastid, mitochondrial and nuclear genomes in plant-to-plant horizontal gene transfer*; (4) *The number of cell types, information content, and the evolution of complex multicellularity*; (5) *The evolution of land plants: a perspective from horizontal gene transfer*; (6) *Paulinella chromatophora – rethinking the transition from endosymbiont to organelle*; (7) *Unique genome evolution in an intracellular N₂-fixing symbiont of a rhopalodiacean diatom*; (8) *A sea slug's guide to plastid symbiosis*.

Cały zeszyt „[Evolution of plant cells](https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/issue/view/336)” dostępny jest pod następującym linkiem:

<https://pbsociety.org.pl/journals/index.php/asbp/issue/view/336>

Dane scjentometryczne dla dorobku habilitacyjnego

h-Index wg Web of Science: 9

h-Index wg Scopus: 9

Sumaryczny IF: 56,289

Liczba cytowań wg Web of Science: 181

Liczba cytowań wg Scopus: 217

Suma punktów MNiSW: 534

6. BIBLIOGRAFIA

1. Agrawal S., Striepen B. (2010) More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist* 161: 672–687.
2. Archibald J.M. (2009) The puzzle of plastid evolution. *Curr. Biol.* 19: R81–R88.
3. Archibald J.M. (2014) One plus One Equals One: Symbiosis and the Evolution of Complex Life. *Oxford: Oxford University Press*.

4. Baudisch B., Langner U., Garz I., Klösigen R.B. (2014) The exception proves the rule? Dual targeting of nuclear-encoded proteins into endosymbiotic organelles. *New Phytol.* 201: 80–90.
5. Bhattacharya D., Archibald J.M. (2006) Response to Theissen and Martin: “The difference between endosymbionts and organelles.” *Curr. Biol.* 16: R1017–R1018.
6. Bhattacharya D., Archibald J.M., Weber A.P., Reyes-Prieto A. (2007) How do endosymbionts become organelles? Understanding early events in plastid evolution. *BioEssays* 29: 1239–1246.
7. Bodył A., Cieśla J., Mackiewicz P., Gagat P. (2017a) Cyanobacterial endosymbionts of *Paulinella chromatophora* shed new light on the birth of cellular organelles. W: Grube M., Seckbach J., Muggia L. (red.) *Algal and Cyanobacteria Symbioses. London: World Scientific Publishing Europe*, s. 279–328.
8. Bodył A., Mackiewicz P., Cieśla J. (2017b) Endosymbiotic theory: models and challenges. W: Roitberg B.D., Fraser S. (red.) *Reference Module in Life Sciences. Elsevier*, s. 1–11.
9. Bodył A., Stiller J.W., Mackiewicz P. (2009) Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol. Evol.* 24: 119–121
10. Burki F. (2014) The eukaryotic tree of life from a global phylogenomic perspective. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 6: a016147.
11. Burki F., Kaplan M., Tikhonenkov D.V., Zlatogursky V., Minh B.Q., Radaykina L.V., Smirnov A., Mylnikov A.P., Keeling P.J. (2016) Untangling the early diversification of eukaryotes: a phylogenomic study of the evolutionary origins of Centrohelida, Haptophyta and Cryptista. *Proc. Biol. Sci.* 283: 20152802.
12. Campbell N.A., Reece J.B., Urry L.A., Cain M.L. Wasserman S.A., Minorsky P.V., Jackson R.B. (2013) *Biologia. Poznań: REBIS.*
13. Cavalier-Smith T. (1992). The number of symbiotic origins of organelles. *BioSystems* 28: 91–106.
14. Cavalier-Smith T. (1999) Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J. Eukaryot. Microbiol.* 46: 347–366.
15. Cavalier-Smith T. (2006) Origin of mitochondria by intracellular enslavement of a photosynthetic purple bacterium. *Proc. Biol. Sci.* 273: 1943–1952.
16. Cavalier-Smith T. (2000) Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 5: 174–182.
17. Cavalier-Smith T., Lee J.J. (1985). Protozoa as hosts for endosymbioses and the conversion of symbionts into organelles. *J. Protozool.* 32: 376–379.

18. Chakraborty A. (2016) Understanding the biology of the *Plasmodium falciparum* apicoplast; an excellent target for antimalarial drug development. *Life Sci.* 158: 104–110.
19. Curtis B.A., Tanifuji G., Burki F., Gruber A., Irimia M., Maruyama S., Arias M.C., Ball S.G., Gile G.H., Hirakawa Y., Hopkins J.F., Kuo A., Rensing S.A., Schmutz J., Symeonidi A., Elias M., Eveleigh R.J., Herman E.K., Klute M.J., Nakayama T., Oborník M., Reyes-Prieto A., Armbrust E.V., Aves S.J., Beiko R.G., Coutinho P., Dacks J.B., Durnford D.G., Fast N.M., Green B.R., Grisdale C.J., Hempel F., Henrissat B., Höppner M.P., Ishida K., Kim E., Kořený L., Kroth P.G., Liu Y., Malik S.B., Maier U.G., McRose D., Mock T., Neilson J.A., Onodera N.T., Poole A.M., Pritham E.J., Richards T.A., Rocap G., Roy S.W., Sarai C., Schaack S., Shirato S., Slamovits C.H., Spencer D.F., Suzuki S., Worden A.Z., Zauner S., Barry K., Bell C., Bharti A.K., Crow J.A., Grimwood J., Kramer R., Lindquist E., Lucas S., Salamov A., McFadden G.I., Lane C.E., Keeling P.J., Gray M.W., Grigoriev I.V., Archibald J.M. (2012) Algal genomes reveal evolutionary mosaicism and the fate of nucleomorphs. *Nature* 492: 59–65.
20. Dufernez F., Yernaux C., Gerbod D., Noël C., Chauvenet M., Wintjens R., Edgcomb V.P., Capron M., Opperdoes F.R., Viscogliosi E. (2006) The presence of four iron-containing superoxide dismutase isozymes in trypanosomatidae: characterization, subcellular localization, and phylogenetic origin in *Trypanosoma brucei*. *Free Radic. Biol. Med.* 40: 210–225.
21. Fast N.M., Kissinger J.C., Roos D.S., Keeling P.J. (2001) Nuclear-encoded, plastid-targeted genes suggest a single common origin for apicomplexan and dinoflagellate plastids. *Mol. Biol. Evol.* 18: 418–426.
22. Gagat P., Bodył A., Mackiewicz P. (2013) How protein targeting to primary plastids via the endomembrane system could have evolved? A new hypothesis based on phylogenetic studies. *Biol. Direct* 8: 18.
23. Gagat P., Bodył A., Mackiewicz P., Stiller J.W. (2014) Tertiary plastid endosymbioses in dinoflagellates. W: Löffelhardt W. (red.) *Endosymbiosis. Wien: Springer Verlag*, s. 233–290.
24. Hannaert V., Saavedra E., Duffieux F., Szikora J.P., Rigden D.J., Michels P.A., Opperdoes F.R. (2003) Plant-like traits associated with metabolism of *Trypanosoma* parasites. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 100: 1067–1071.
25. He D., Sierra R., Pawlowski J., Baldauf S.L. (2016) Reducing long-branch effects in multi-protein data uncovers a close relationship between Alveolata and Rhizaria. *Mol. Phylogenet. Evol.* 101: 1–7.

26. Jackson C., Clayden S., Reyes-Prieto A. (2015) The Glaucophyta: the blue-green plants in a nutshell. *Acta Soc. Bot. Pol.* 84: 149–165.
27. Marin B., Nowack E.C., Melkonian M. (2005) A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis. *Protist* 156: 425–432.
28. Moore C.E., Archibald J.M. (2009) Nucleomorph genomes. *Annu. Rev. Genet.* 43: 251–264.
29. Nowack E.C., Grossman A.R. (2012) Trafficking of protein into the recently established photosynthetic organelles of *Paulinella chromatophora*. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 109: 5340–5345.
30. Nowack E.C., Melkonian M., Glöckner G. (2008) Chromatophore genome sequence of *Paulinella* sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes. *Curr. Biol.* 18: 410–418.
31. Patron N.J., Rogers M.B., Keeling P.J. (2004) Gene replacement of fructose-1,6-bisphosphate aldolase supports the hypothesis of a single photosynthetic ancestor of chromalveolates. *Eukaryot. Cell.* 3: 1169–1175.
32. Pino P., Foth B.J., Kwok L.Y., Sheiner L., Schepers R., Soldati T., Soldati-Favre D. (2007) Dual targeting of antioxidant and metabolic enzymes to the mitochondrion and the apicoplast of *Toxoplasma gondii*. *PLoS Pathog.* 3: e115.
33. Rice D.W., Palmer J.D. (2006) An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol.* 4: 31.
34. Roger A.J., Muñoz-Gómez S.A., Kamikawa R. (2017) The origin and diversification of mitochondria. *Curr. Biol.* 27: R1177-R1192.
35. Rogers M., Keeling P.J. (2004) Lateral transfer and recompartmentalization of Calvin cycle enzymes of plants and algae. *J. Mol. Evol.* 58: 367–75.
36. Rogers M.B., Gilson P.R., Su V., McFadden G.I., Keeling P.J. (2007) The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigeloviella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol. Biol. Evol.* 24: 54–62.
37. Rusterholz P.M., Hansen P.J., Daugbjerg N. (2017) Evolutionary transition towards permanent chloroplasts? – Division of kleptochloroplasts in starved cells of two species of *Dinophysis* (Dinophyceae). *PLoS One* 12: e0177512.
38. Shi L.X., Theg S.M. (2013) The chloroplast protein import system: from algae to trees. *Biochim. Biophys. Acta* 1833: 314–331.
39. Singer A., Poschmann G., Mühlich C., Valadez-Cano C., Hänsch S., Hüren V., Rensing S.A., Stühler K., Nowack E.C.M. (2017) Massive protein import into the early-

- evolutionary-stage photosynthetic organelle of the amoeba *Paulinella chromatophora*. *Curr. Biol.* 27: 2763–2773.e5.
40. Solomon E.P., Berg L.R., Martin D.W. (2014) *Biologia*. Warszawa: MULTICO Oficyna Wydawnicza.
 41. Stiller J.W., Huang J., Ding Q., Tian J., Goodwillie C. (2009) Are algal genes in non-photosynthetic protists evidence of historical plastid endosymbioses? *BMC Genomics* 10: 484.
 42. Stiller J.W., Schreiber J., Yue J., Guo H., Ding Q., Huang J. (2014) The evolution of photosynthesis in chromist algae through serial endosymbioses. *Nat. Commun.* 5: 5764.
 43. Takishita K., Ishida K., Maruyama T. (2004) Phylogeny of nuclear-encoded plastid-targeted GAPDH gene supports separate origins for the peridinin- and the fucoxanthin derivative-containing plastids of dinoflagellates. *Protist* 155: 447–458.
 44. Theissen U., Martin W. (2006) The difference between organelles and endosymbionts. *Curr. Biol.* 16: R1016–R1017.
 45. Wisecaver J.H., Hackett J.D. (2010) Transcriptome analysis reveals nuclear-encoded proteins for the maintenance of temporary plastids in the dinoflagellate *Dinophysis acuminata*. *BMC Genomics* 11: 366.
 46. Xu P., Widmer G., Wang Y., Ozaki L.S., Alves J.M., Serrano M.G., Puiu D., Manque P., Akiyoshi D., Mackey A.J., Pearson W.R., Dear P.H., Bankier A.T., Peterson D.L., Abrahamsen M.S., Kapur V., Tzipori S., Buck G.A. (2004) The genome of *Cryptosporidium hominis*. *Nature* 431: 1107–1112.
 47. Yoon H.S., Hackett J.D., Van Dolah F.M., Nosenko T., Lidie K.L., Bhattacharya D. (2005) Tertiary endosymbiosis driven genome evolution in dinoflagellate algae. *Mol. Biol. Evol.* 22: 1299–1308.
 48. Yoon H.S., Reyes-Prieto A., Melkonian M., Bhattacharya D. 2006. Minimal plastid genome evolution in the *Paulinella* endosymbiont. *Curr. Biol.* 16: R670–R672.

A.B.✓