

STRESZCZENIE

W komórkach eukariotycznych DNA występuje głównie w formie liniowej, upakowanej w chromosomy. Poza tym może też przybierać postać kolistych cząsteczek. Najdokładniej zbadane zostały koliste DNA odgrywające rolę genomów mitochondriów i chloroplastów. Niemniej zasób kolistych DNA u Eukarya jest znacznie szerszy. Obejmuje również pozachromosomowe cząsteczki (ang. *extrachromosomal circular DNA*; eccDNA): koliste formy rDNA, pierścienie telomerowe, małe polidispersyjne DNA, mikroDNA oraz inne typy kolistych DNA o pochodzeniu jądrowym. Występowanie eccDNA potwierdzono u wszystkich organizmów testowanych w tym zakresie. Dotychczasowe badania wykazały, że niektóre eccDNA są obecne na każdym etapie cyklu komórkowego, podczas gdy inne pojawiają się i/lub ulegają nagromadzeniu w szczególnych okolicznościach. Dowiedziono, że akumulacja eccDNA nierzadko zachodzi w następstwie poważnej destabilizacji genomu, będącej wynikiem stanów chorobowych czy stresu. Choć w środowisku naukowym wzrasta zainteresowanie eccDNA, pozostają one słabo poznanym składnikiem genomów eukariotycznych. Nadal niewiele wiadomo na temat mechanizmów ich formowania, ewolucji oraz ich funkcji biologicznych.

WPROWADZENIE

Przez długi czas środowisko naukowe postrzegało genomy eukariotyczne jako twory stosunkowo stabilne i mocno konserwowane, a także niezdolne do natychmiastowej odpowiedzi na działanie czynników środowiskowych. Uważano, że wszelkie zmiany w genomach zachodzą powoli, w wyniku długofalowych procesów ewolucyjnych. Prężny rozwój biologii molekularnej, szczególnie w kilku ostatnich dekadach, pozwolił zrewidować ten pogląd. Pojawienie się i doskonalenie technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania umożliwiły wgląd w architekturę genomów na niespotykaną dotąd skalę [1,2]. Badania wykazały, że genomy eukariotyczne są zdecydowanie bardziej plastyczne niż do niedawna sądzono. Jednym z przejawów tej zmienności jest powstawanie kolistych, pozachromosomowych cząsteczek DNA (ang. *extrachromosomal circular DNA*; eccDNA) [3].

Endogenne, fizycznie odseparowane od chromosomów koliste molekuly DNA występują w komórkach eukariotycznych głównie w postaci materiału genetycznego organelli półautonomicznych: mitochondriów i chloroplastów. Od dziesięcioleci dostrzegano u Eukarya również koliste cząsteczki DNA o pochodzeniu jądrowym. Koliste DNA początkowo obserwowano u pojedynczych organizmów należących do odległych linii ewolucyjnych, toteż brano je raczej za artefakt [2,3].

Obecnie dzięki nowoczesnym technikom obrazowania oraz wysokoprzepustowym analizom genomowym, pozwalającym na analizy całego „cyrkulomu” (zasobu kolistych cząsteczek DNA występujących w danym organizmie) wiadomo, że eccDNA są bardzo zróżnicowaną grupą cząsteczek. Ich pojawienie się w komórkach może być przejawem normalnego funkcjonowania lub towarzyszyć destabilizacji genomu w wyniku procesów chorobowych, starzenia lub ekspozycji na szkodliwe czynniki środowiskowe [4,5].

ZNANE TYPY KOLISTYCH DNA U EUKARYA

Koliste DNA odgrywają wiele istotnych ról w komórkach eukariotycznych. Uczestniczą w rozmaitych procesach biologicznych. Niektóre z tych cząsteczek są obecne w komórce cały czas, podczas gdy inne pojawiają się pod wpływem określonych czynników lub w konkretnej fazie cyklu komórkowego. Cząsteczki te są zróżnicowane pod względem pochodzenia, zawartości, rozmiarów, liczebności w komórce oraz pełnionych funkcji (Tabela 1) [2,4,6].

dr Natalia Gumińska^{1,2}✉,

dr hab. Rafał Milanowski²

¹Laboratorium Biologii RNA, Międzynarodowy Instytut Biologii Molekularnej i Komórkowej, Warszawa

²Instytut Biologii Ewolucyjnej, Wydział Biologii, Centrum Nauk Biologiczno-Chemicznych, Uniwersytet Warszawski

https://doi.org/10.18388/pb.2021_423

✉ autor korespondujący: nguminska@iimcb.gov.pl

Słowa kluczowe: cyrkulom, koliste DNA, pozachromosomowy DNA, plastyczność genomu, naprawa DNA

Podziękowanie: Praca powstała podczas realizacji projektu badawczego 2017/27/N/NZ2/01321 finansowanego przez Narodowe Centrum Nauki.

Tabela 1. Wykaz znanych typów kolistych DNA u Eukarya scharakteryzowanych w pracy.

Typ	Rozmiar (w parach zasad)	Funkcje biologiczne
pozachromosomowe DNA (ecDNA; DM)	1 000 000–3 000 000	Nośniki protoonkogenów lub genów lekooporności.
chloroplastowy DNA (cpDNA)	30 000–500 000 – glony 120 000–160 000 – rośliny wyższe	Zawiera geny kluczowe do przeprowadzania fotosyntezy.
mitochondrialny DNA (mtDNA)	2 000 – najmniejszy poznany (<i>Chromera velia</i>); ~30 000 – średnio; 16 569 – człowiek; 256 000 000 – największy poznany (<i>Diplonema papillatum</i>); rozproszony – w postaci zestawu cząsteczek o wielkości 6 000 i 7 000 par zasad	Zawiera geny niezbędne do funkcjonowania mitochondriów.
elementy NR	20 000–50 000	Niepoznane.
kinetoplastowe maksichromosomy	20 000–40 000	Kodują kinetoplastowe rRNA i białka.
kinetoplastowe minichromosomy	500–10 000	Produkują gRNA umożliwiające edycję informacji genetycznej zawartej w maksichromosomach.
koliste rDNA (rDNAcircle)	9 100–24 500	Zawierają macierz rDNA. Akumulacja związana ze starzeniem replikacyjnym.
koliste DNA Oxytricha	3 000–15 000	Odtwarzanie jądra wegetatywnego po procesach płciowych u orzęsków.
telomerowe koliste DNA	700–56 800 – człowiek	Matryce w alternatywnym wydłużaniu telomerów przez rekombinację homologiczną. Skracanie wydłużonych telomerów.
małe polidispersyjne DNA (spcDNA)	100–10 000	Inicjacja lub wzmacnianie niestabilności genomu.
mikroDNA	100–400	Matryca do powstawania małych niekodujących RNA o znaczeniu regulatorowym.

KOLISTY DNA W ROLI GENOMU ORGANELLARNEGO

Genomy organelli półautonomicznych są nośnikami informacji genetycznej niezbędnej do prawidłowego funkcjonowania tych struktur komórkowych. Zostały nabyte wraz z zawierającymi je organellami. Materiał genetyczny organelli w ewolucyjnej skali czasu, odkąd przestały one być wolno żyjącymi organizmami, ulegał stopniowej redukcji. Kontrola nad niektórymi kluczowymi procesami metabolicznymi została przekazana do jądra. Ze względu na barierę przestrzenną, genomy organellarne i jądrowy wchodzą ze sobą w ograniczone interakcje.

MITOCHONDRIALNY DNA (mtDNA)

Mitochondria to organelle odpowiedzialne za syntezę adenozyno-5'-trifosforanu (ATP) – nośnika energii użytecznej biologicznie [7]. Powstały około 1,5-2 miliardów lat temu w wyniku jednorazowego zdarzenia, w którym wolno żyjący organizm zbliżony do dzisiejszych bakterii purpurowych został endosymbiontem przodka komórki eukariotycznej. W toku ewolucji większość genów mitochondrialnych została przeniesiona do genomu jądrowego albo utracona [8].

Genomy mitochondrialne poszczególnych organizmów różnią się wielkością, topologią oraz potencjałem kodującym [8], [9]. Rozmiary zbadanych genomów mitochondrialnych nie odzwierciedlają stopnia złożoności organizmu. Oscylują w granicach od około 2 tysięcy par zasad u jednokomórkowca *Chromera velia* do ponad 256 milionów par zasad u innego mikroorganizmu *Diplonema papillatum* [10,11]. Dla porównania: ludzki genom mitochondrialny obejmuje

około 16,5 tysiąca par zasad, podczas gdy uśredniona wielkość typowego genomu mitochondrialnego to około 30 tysięcy par zasad [7, 12].

Większość dotychczas poznanych genomów mitochondrialnych została zmapowana jako pojedynczy kolisty lub liniowy chromosom [13]. Ludzki genom mitochondrialny przyjmuje formę dwuniciowej kolistej cząsteczki. Nici wchodzące w skład mtDNA różnią się masą cząsteczkową – mogą być odseparowane od siebie poprzez wirowanie w gradiencie chlorku cezu. Nic ciężka jest bogatsza w nukleotydy guanylowe od nici lekkiej [7].

W przyrodzie spotyka się też bardziej skomplikowane formy organizacji mtDNA. Na przykład genomy mitochondrialne wrotków z rodzaju *Brachionus* występują w postaci dwóch kolistych cząsteczek, u nicieni należących do rodzaju *Globodera* składają się z sześciu pierścieni mtDNA, zaś u niektórych gatunków wszy genom mitochondrialny może być rozproszony nawet w dwudziestu niewielkich kolistych chromosomach [9]. Jeszcze większym zróżnicowaniem genomów mitochondrialnych charakteryzują się mikroorganizmy jednokomórkowe.

Przykładowo, mitochondrialny DNA diplonemidów – cudzożywnych wiciowców morskich – obejmuje zestaw kolistych chromosomów o wielkości 6 i 7 tysięcy par zasad [14]. Całkowite rozmiary mtDNA tych organizmów mogą wynosić nawet 256 milionów par zasad; średnio 600 tysięcy par zasad. Genom mitochondrialny diplonemidów ma przy tym zaskakująco niski potencjał kodujący: niespełna 5% każdego pierścienia DNA jest niepowtarzalny, zaś reszta

to bloki powtórzeń [15]. Geny mitochondrialne diplo-nemidów są rozbite na niewielkie fragmenty zwane modułami, a każdy chromosom zawiera tylko jeden z nich. Poszczególne moduły ulegają transkrypcji niezależnie od siebie. Ich łączenie w pojedynczą sekwencję mRNA zachodzi wskutek następujących po sobie reakcji składania w układzie *trans* [15]. Transkrypty mitochondrialne diplo-nemidów są następnie redagowane poprzez insercje urydyny (i prawdopodobnie guanozyny), substytucje: adenozyne przez inozynę, cytozyny przez urydynę i guanozyny przez adenozyne oraz polia-denylację [14,16].

Badania filogenetyczne wskazują, że najbardziej zbliżony do mitochondrialnego jest genom *Rickettsia prowazekii* – bakterii wywołującej tyfus plamisty. Z drugiej strony spośród znanych genomów mitochondrialnych, mtDNA należący do wiciowca *Reclinomonas americana* najbardziej przypomina genomy bakteryjne. Zawiera 97 genów, w tym 62 kodujące białka. Geny białkowe *Reclinomonas* obejmują pełen zasób genów białkowych wykrytych w dotychczas zsekwencjonowanych genomach mitochondrialnych, co potwierdza monofiletyczność mitochondriów [17].

Genomy mitochondrialne zwierząt wielokomórkowych zwykle są kompaktowe: geny leżą blisko siebie, a niekiedy nawet na siebie zachodzą. Przeważnie też nie zawierają intronów. Natomiast u innych organizmów mtDNA charakteryzuje się większymi rozmiarami, mniej zwartą strukturą oraz częstszym występowaniem intronów [8, 9]. Mitochondrialny DNA człowieka zawiera 37 genów, 13 z nich koduje ogniwa łańcucha oddechowego, a pozostałe 24 – mitochondrialną maszynę translacyjną: 22 rodzaje tRNA i 2 typy rRNA [7,18].

Niewielka zawartość genów w mtDNA wiąże się ze znacznie mniej zróżnicowanym repertuarem kodonów w porównaniu z genomem jądrowym – co za tym idzie, kod genetyczny mitochondriów różni się od kodu genetycznego w genomie jądrowym. Przykładowo, kodon UGA standardowo sygnalizujący zakończenie translacji, w mtDNA wielu organizmów oznacza tryptofan. Z kolei AUA, który w genomie jądrowym koduje izoleucynę – w mtDNA odpowiada metioninie [7].

Mimo znacznej redukcji rozmiarów genomu, mitochondria zachowały odrębny system ekspresji genów. Replikacja genomu mitochondrialnego również zachodzi niezależnie od genomu jądrowego i cyklu komórkowego. Ponadto dziedziczenie informacji genetycznej zawartej w mtDNA nie odbywa się zgodnie z prawami Mendla. U człowieka mitochondria są przekazywane niemal wyłącznie w linii matczynej [7,19]. W pojedynczym mitochondrium może znajdować się kilka(set) kopii genomu mitochondrialnego, zaś w komórce – kilka tysięcy. Co więcej, kopie te nie zawsze są identyczne – zjawisko to nosi nazwę heteroplazmii [7].

KINETOPLASTOWY DNA (KDNA)

Jest skomplikowaną strukturalnie odmianą mitochondrialnego DNA, występującą u kinetoplastydów – jednokomórkowych wiciowców, do których należą organizmy wolno żyjące oraz pasożytnicze (w tym świdorowce patogenne

dla człowieka – wywołujące śpiączkę afrykańską czy chorobę Chagasa) [20]. Kinetoplastowy DNA składa się z dwóch rodzajów kolistych dwuniciowych cząsteczek, różniących się rozmiarami oraz liczbą kopii w komórce: niewielu mak-sichromosomów (20–40 tysięcy par zasad) i licznych mini-chromosomów (0,5–10 tysięcy par zasad). Pierwsze z nich kodują geny białkowe i rRNA pochodzenia bakteryjnego, podczas gdy drugie zawierają geny naprowadzającego RNA (ang. *guide RNA*; gRNA), biorącego udział w edycji transkryptów genów zawartych w maksichromosomach poprzez insercję i/lub delecję urydyny [14,20].

Maksichromosomy są zbudowane z dwóch segmentów: dłuższego, konserwowanego obszaru, obejmującego wszystkie geny kodujące białka i rRNA oraz krótszego rejonu o zmiennej sekwencji, prawdopodobnie odpowiadającego za replikację [21].

Kinetoplastowy DNA może tworzyć rozbudowaną sieć splecionych z sobą pierścieni DNA, w przekroju przypominającą kolczugę. Taka organizacja przestrzenna na ogół występuje u gatunków pasożytniczych. Z kolei u organizmów wolno żyjących kDNA przyjmuje postać swobodnych, luźno rozmieszczonych cząsteczek [14,20,21].

CHLOROPLASTOWY DNA (cpDNA)

Głównymi zadaniami chloroplastów są przechwytywanie i zamiana energii światła słonecznego w energię wiązań chemicznych. Organelle te, podobnie jak mitochondria, zostały nabyte wskutek endosymbiozy, chociaż ich ewolucja przebiegała w bardziej złożony sposób [22]. Około 1,5 miliarda lat temu doszło do pierwotnej endosymbiozy pomiędzy sinicą a komórką eukariotyczną, będącą wspólnym przodkiem zielenic i roślin lądowych, krasnorostów oraz glaukofitów. Następnie chloroplasty pochodzące od zielenic i krasnorostów były wielokrotnie wtórnie nabywane (oraz tracone) przez kolejne linie eukariontów [23].

Chloroplasty posiadają własny DNA oraz maszynę molekularną umożliwiającą jego powielanie i ekspresję. Materiał genetyczny chloroplastów zwykle przyjmuje formę pojedynczej, dwuniciowej kolistej cząsteczki [22]. Z licznych doniesień wynika, że genomy chloroplastowe mogą też ulegać linearyzacji lub być zorganizowane inaczej [24,25]. U brunatnicy *Pylaiella littoralis* cpDNA występuje w postaci dwóch kolistych cząsteczek o wielkości 133 i 58 tysięcy par zasad [26]. Z kolei u niektórych bruzdnic (jednokomórkowych glonów) z rodzajów *Heterocapsa*, *Amphidinium*, *Protoceratium* i *Symbiodinium* pojedyncza kopia genomu chloroplastowego obejmuje zbiór kolistych cząsteczek o rozmiarach 2,2–3,8 tysiąca par zasad [27].

Rozmiary genomów plastydowych glonów wahają się od 30 tysięcy par zasad u *Symbiodinium*, do ponad 0,5 miliona par zasad u *Volvox carteri* [8,28]. Z kolei genomy chloroplastowe roślin bywają mniej zróżnicowane pod tym względem. Najczęściej osiągają wielkość 120–160 tysięcy par zasad [22].

Typowy genom chloroplastowy składa się z czterech podstawowych segmentów: dwóch niepowtarzalnych ob-

szarów: dużego i małego, oraz dwóch powtórzonych rejonów o przeciwnej orientacji. Geny kodujące białka i tRNA z reguły znajdują się w obszarach jednokopijnych, podczas gdy rejony repetytywne zawierają operon rybosomalny, kilka genów tRNA, a czasem również nieliczne geny kodujące białka [22]. Odstępstwa od tego układu wiążą się przede wszystkim z utratą niektórych genów i/lub ich przetasowaniem, a także zmianą liczby tandemowych powtórzeń [29]. Przykładowo, u niektórych roślin lądowych i zielenic, np. pryzynofitów i streptofitów, nastąpił zanik jednego z seryjnych powtórzeń [30,31].

W chloroplastowym DNA można wyodrębnić geny kodujące białka (głównie związane z fotosyntezą), rRNA i tRNA oraz odcinki międzygenowe. Niektóre genomy plastydowe są bogate w introny. Zdecydowana większość białek obecnych w chloroplastach jest kodowana jądrowo, syntetyzowana w cytoplazmie, a następnie transportowana do wnętrza plastydów [8,22]. Standardowy genom chloroplastowy obejmuje około 120 genów. Większość z nich jest niezbędna do przeprowadzania reakcji świetlnych fotosyntezy, transkrypcji oraz translacji. Niektóre geny w różnych liniach ewolucyjnych mogły zostać przekazane do jądra, inaktywowane albo utracone [8,30]. Poszczególne genomy chloroplastowe różnią się od siebie repertuarem zachowanych genów. Do najbogatszych w geny (około 250 genów) należą genomy plastydowe krasnorostów [8,22]. Z kolei u organizmów, które wtórnie utraciły zdolność do fotosyntezy, genomy plastydowe uległy redukcji, a w skrajnych przypadkach – zanikowi, tak jak to ma miejsce w przypadku raflezji (pasożytniczej rośliny) [32].

Genom plastydowy z reguły ewoluuje wolniej niż genom jądrowy. Za taki stan rzeczy odpowiada kilka czynników, takich jak organizacja genów (które są zebrane w operony), sposób transmisji plastydów czy wydajność plastydowych mechanizmów naprawczych [8,22]. Substytucje nukleotydowe w genomach chloroplastowych roślin nasiennych zachodzą trzy razy rzadziej niż w DNA zawartym w jądrze komórkowym [8,30].

POZACHROMOSOMOWE KOLISTE DNA

Pozachromosomowe koliste DNA występują we wszystkich komórkach eukariotycznych [2,3,6]. Częstotliwość eccDNA to szerokie spektrum molekuł różnicowanych pod względem rozmiaru (od kilkuset do nawet kilku milionów par zasad), złożoności sekwencji, zawartości nukleotydów GC oraz liczby kopii znajdujących się w pojedynczej komórce [2,4].

Najdokładniej opisane eccDNA o pochodzeniu jądrowym zawierają motywy homologiczne do chromosomalnego DNA. Mogą wywodzić się z unikatowych obszarów wewnątrz- i międzygenowych, jednak ich głównym źródłem są skupiska tandemowych powtórzeń, zgrupowanych w obrębie i/lub bliskim sąsiedztwie sekwencji kodujących albo w rejonach centromerów i telomerów. Tego typu cząsteczki stanowią zdecydowaną większość eccDNA w komórkach roślinnych i zwierzęcych [3,33].

Wśród kolistych DNA niezwiązanych z organellami pół-autonomicznymi wyodrębnia się między innymi: (I) koliste rDNA, (II) koliste telomerowe DNA, (III) małe polidispersyjne DNA, (IV) mikroDNA, (V) pozachromosomowe DNA (dawniej małe acentryczne chromosomy) oraz (VI) inne pozachromosomowe elementy genetyczne, niosące fragmenty kanonicznych, liniowych *loci*, transpozony, a nawet sekwencje wywodzące się od genomów wirusowych [4,34].

KOLISTE rDNA (rDNA^{CIRCLE})

Rybosomalny DNA (rDNA) koduje RNA wykorzystywane do produkcji rybosomów – organelli odpowiedzialnych za syntezę białek komórkowych. U większości eukariotów rDNA składa się z tandemowo powtórzonych bloków czterech lub pięciu genów zlokalizowanych w pojedynczym chromosomie lub w kilku [35,36].

Geny rRNA mogą też znajdować się w pozachromosomowych kolistych lub liniowych cząsteczkach. Taki typ organizacji rDNA wykryto u przedstawicieli różnych linii rozwojowych mikroeukariotów [37-39]. U orzęska *Paramecium tetraurelia* rybosomalny DNA stanowi zbiór liniowych i kolistych molekuł, które mogą zawierać nawet 413 powtórzeń operonu rDNA [38]. Z kolei u ameby *Entamoeba histolytica* rDNA przyjmuje formę pierścieni o rozmiarach 24,5 tysiąca par zasad. Częstotliwość te zawierają dwie identyczne kopie rDNA oddzielone od siebie obszarami międzygenowymi o zmiennych sekwencjach. Ustalono, że obydwie jednostki rDNA są aktywne transkrypcyjnie [40]. Organizm ten może dysponować około 200 cząsteczkami rDNA^{circle}, zarazem nie posiadając chromosomowej kopii rDNA. Replikacja rDNA^{circle} *E. histolytica* może być rozpoczynana w wielu punktach. Podstawowe miejsca inicjacji replikacji leżą w sąsiedztwie promotorów polimerazy DNA I. Oprócz nich pierścieni rDNA zawiera inne, kryptyczne ori, których aktywacja następuje w odpowiedzi na stres [38]. Inaczej zorganizowane rDNA^{circles} występują u przedstawicieli rodzaju *Naegleria*. U tych ameb rDNA przyjmuje wyłącznie postać kolistych cząsteczek o wielkości rzędu kilkunastu tysięcy par zasad. Każda z nich zawiera pojedynczą kopię rDNA oraz długi obszar obejmujący pojedyncze miejsce inicjacji replikacji, samowycinający się intron grupy pierwszej (nie u wszystkich), rejony tandemowych powtórzeń i domniemane ramki odczytu [41].

Również u klejnotek większość genów kodujących rRNA znajduje się w kolistych, pozachromosomowych cząsteczkach, choć ich skład odbiega od rozwiązań obserwowanych u ameb. U *Euglena gracilis* – modelowej klejnotki – rDNA^{circles} zawierają 11 056 par zasad i występują w komórkach w 800-4000 kopii [37]. Każdy z tych pierścieni zawiera pojedyncze kopie poszczególnych genów rDNA ułożone w tej samej kolejności. Gen kodujący RNA małej podjednostki rybosomu jest oddzielony pierwszym wewnętrznym transkrybowanym łącznikiem od 5,8S rRNA, po którym znajdują się: kolejny wewnętrzny transkrybowany łącznik, pozostałe geny kodujące dużą podjednostkę rybosomu (również odseparowane od siebie krótkimi sekwencjami) oraz zewnętrzny transkrybowany łącznik [42].

TELOMEROWE KOLISTE DNA

Cząsteczki rDNA^{circle} poszczególnych gatunków klejnotek różnią się wielkością i (w pewnym zakresie) kompozycją. Powielają się niezależnie od DNA chromosomalnego [37]. Posiadają również pojedyncze miejsce inicjacji transkrypcji, zlokalizowane wewnątrz sekwencji niekodującej, pomiędzy ostatnim genem kodującym RNA dużej podjednostki rybosomu a genem kodującym RNA małej podjednostki [42,43]. Geny kodujące 5S rRNA jako jedyne spośród jądrowych rDNA klejnotek nie są zawarte w kolistych cząsteczkach, lecz są rozsiane w różnych miejscach na chromosomach [43].

Z kolei u drożdży piekarniczych (*Saccharomyces cerevisiae*) podstawowa macierz rDNA jest zlokalizowana na chromosomie XII. Składa się z sekwencji o długości 9,1 tysiąca par zasad powtórzonej 100–200 razy [44,45]. Ponadto w komórkach drożdży występują także kolisty cząsteczki rDNA zbudowane z fragmentów tej macierzy (19,3–40,4 tysiący par zasad) [39]. W skład ich sekwencji wchodzi odcinki umożliwiające replikację niezależną od DNA chromosomalnego [39,45].

Podczas podziału większość kolistych rDNA jest zatrzymywana w komórkach maczynych. Natomiast w komórkach potomnych populację rDNA^{circle} tworzą głównie cząsteczki uformowane później [39,46]. Zauważono, że w drożdżach pozbawionych helikazy Sgs1 chroniącej DNA przed uszkodzeniami (pofragmentowaniem), kolisty rDNA ulegają szybszemu i większemu nagromadzeniu, niż w organizmach o fenotypie dzikim [39]. Choć okręgi rDNA są akumulowane podczas życia komórki, ich rola w starzeniu replikacyjnym jest niejasna. Wiadomo jednak, że znaczny wzrost frekwencji tych strukturalnych izoform może skutkować skróceniem życia komórki maczynnej [46]. Ustalono też, że nieuszkodzony chromosomalny rDNA, w przeciwieństwie do rDNA^{circle}, jest niezbędny u drożdży do zachowania prawidłowego metabolizmu komórki [44].

Telomery to powtarzające się sekwencje nukleotydów (np. TTAGGG/CCCTAA u ssaków) zlokalizowane na końcach chromosomów. Ich zadanie polega na ochronie DNA przed degradacją i nieprawidłową rekombinacją. Skracanie telomerów może prowadzić do destabilizacji genomu, ma związek ze starzeniem i nowotworzeniem [47].

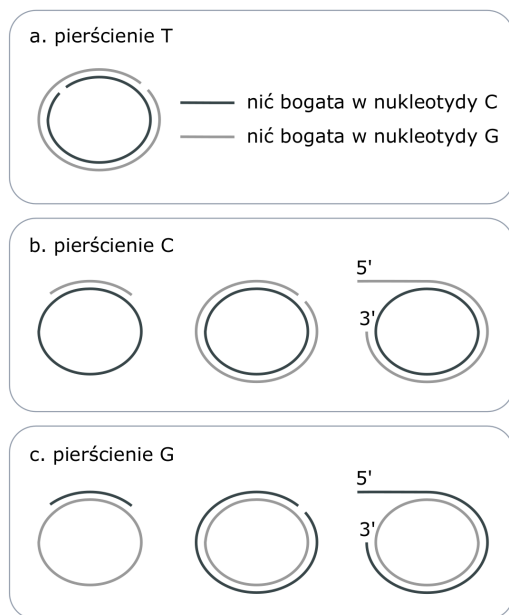
Pierścienie DNA mogą uczestniczyć w skracaniu telomerów i/lub w ich alternatywnym wydłużaniu (ang. *alternative telomere lengthening*; ALT). Proces przebiega dwustopniowo. Wpierw kolisty cząsteczki ulegają replikacji zgodnie z modelem toczącego się koła, co prowadzi do powstania długich fragmentów liniowych. Następnie odcinki te zostają ponownie zintegrowane z końcami chromosomów [5,6]. Zjawisko to po raz pierwszy zaobserwowano w genomach mitochondrialnych drożdży. Obecnie wiadomo, że w określonych typach komórek nowotworowych (ALT+) opisany mechanizm jest głównym szlakiem wydłużania telomerów [5].

Telomery są źródłem trzech typów kolistych DNA: okręgów T, C i G (Ryc. 1). Pierścienie T (ang. *t-circles*) to dwuniciowe molekuly. Każda z tworzących je nici posiada pęknięcia (ang. *nicks*), przez co cząsteczki te nie występują w formie superzwiniętej. Brak ciągłości nici sprawia też, że nie mogą ulegać samopowieleniu (ang. *self-priming*) zgodnie z modelem toczącego się koła. Okręgi C (ang. *c-circles*) to zróżnicowana grupa kolistych cząsteczek zawierających liczne nukleotydy cytydylowe: (I) dwuniciowych z jednonicowym pęknięciem, (II) z niewielkim rejonem dwuniciowym, poza tym jednonicowych oraz (III) dwuniciowych, z jedną nicią o wolnym (dłuższym) końcu 5'. Analogicznie do nich zbudowane pierścienie G (ang. *g-circles*) są bogate w nukleotydy guanylowe [48].

Telomerowe kolisty DNA najczęściej tworzą się wskutek wewnątrzcząsteczkowej rekombinacji między powtórzeniami telomerowymi albo w wyniku wycięcia uprzednio wypętlonego rejonu telomeru [49]. Okręgi T mogą powstawać za sprawą białka naprawczego XRCC3, które rozwiązuje struktury krzyżowe, uformowane przez zetknięcie się pętli telomerowych. Okręgi T i G występują we wszystkich typach komórek (normalnych i nieśmiertelnych). Zwiększenie zawartości pierścieni T i C w komórkach może być efektem przycinania telomerów wydłużonych przez ALT. Pierścienie C są wykrywane w komórkach ALT+, ale nie w komórkach zdolnych do ekspresji genu telomerazy lub śmiertelnych [48].

MAŁE POLIDYSPERSYJNE DNA (spcDNA)

Stanowią heterogenną grupę niewielkich cząsteczek o długości od kilkuset do kilku tysięcy par zasad (zwykle poniżej 500 par zasad). Źródłem większości spcDNA są rejonu chromosomalne o wysokiej zawartości powtórzeń nukleotydowych – spcDNA przeważnie zawierają sekwencje telomerowe, mikrosatelitarne, Alu oraz inne tandemowe powtórzenia [6,50]. Nieliczne spcRNA składają się z fragmentów DNA mapujących do pojedynczych, określonych *loci*. Odcinki te mogą być oflankowane krótkimi (9–11 par



Rycina 1. Typy telomerowych kolistych DNA.

zasad) dokładnymi powtórzeniami, jednak ich obecność nie jest regułą [6,45].

Za powstawanie spcDNA najprawdopodobniej odpowiadają rekombinacje i rearanżacje w obrębie chromosomów, zaburzenia w działaniu maszyneryi replikacyjnej oraz transpozycje. W syntezie tych kolistych cząsteczek może też uczestniczyć ligaza IV [6].

Na podstawie eksperymentów z wykorzystaniem egzonukleazy III do trawienia cząsteczek DNA w postaciach liniowej i kolistej z jednoniciowym pęknięciem, a następnie wirowania pozostałych w preparatach kolistych cząsteczek DNA (odpornych na działanie enzymu) w gradiencie gęstości ustalono, że zawartość spcDNA w poszczególnych tkankach jest zróżnicowana [50]. Choć spcDNA są szeroko rozpowszechnione wśród Eukarya, zwykle występują w niewielkich ilościach. Wysoką zawartość spcDNA obserwuje się między innymi w komórkach nowotworowych (HeLa, rak piersi, rak jelita grubego), fibroblastach pobranych od pacjentów cierpiących na anemię Fanconiego oraz w komórkach poddanych działaniu mutagenów [6]. Zatem obecność spcDNA często ma związek z niestabilnością genomu. Autonomicznie replikujące się spcDNA mogą indukować zmiany w strukturze chromosomów oraz we wzorcach ekspresji genów [2].

mikroDNA

Ten rodzaj kolistych DNA obejmuje krótkie (100–400 par zasad) jedno- lub dwuniciowe cząsteczki pochodzące z określonych, niepowtarzających się *loci* genomowych. Zazwyczaj powstają w obszarach o dużej gęstości genów i eksonów, w sąsiedztwie promotorów aktywowanych przez modyfikacje chromatyny oraz w regionach genomu intensywnie oddziałujących z polimerazą II RNA. W plemnikach ich źródłem są rejony 5' niepodlegające translacji (5'UTR) długich elementów rozproszonych LINE-1 [2,6,51]. MikroDNA są bogate w nukleotydy GC i zawierają krótkie powtórzenia nukleotydowe (2–15 par zasad). Fragmenty te są zlokalizowane na końcach sekwencji, zanim dojdzie do jej zamknięcia w pierścien [51]. Cząsteczki te są zbyt małe, by zawierać kompletne sekwencje genów kodujących białka [2,6,51].

Biosynteza mikroDNA następuje w związku z naprawą pęknięć DNA w postaci rekombinacji homologicznej (ang. *homologous recombination*; HR) lub łączenia niehomologicznych zakończeń (ang. *non-homologous end joining*; NHEJ). Jednoniciowe mikroDNA mogą formować się, gdy wskutek poślizgu lub blokady replikacji DNA dojdzie do utworzenia pętli, która następnie zostanie wycięta. Z kolei dwuniciowe mikroDNA mogą być rezultatem działania mechanizmów naprawczych DNA lub powstawać z jednoniciowych mikroDNA [6,51].

W celu zbadania funkcji tych cząsteczek przeprowadzono doświadczenia z wykorzystaniem sztucznie wygenerowanych molekuł, które miały naśladować znane, naturalnie występujące mikroDNA [6,52]. Wykazano, że mikroDNA ulegają transkrypcji *in vitro* oraz *in vivo* w sposób niezależny od kanonicznych promotorów – stanowią matrycę do synte-

zy małych regulatorowych RNA, w tym małych interferujących RNA [52]. W ten sposób mikroDNA mogą wpływać na ekspresję genów. Dowiedziono, że komórki nowotworowe uwalniają specyficzne rodzaje mikroDNA, które mogą być wykrywane w surowicy i osoczu krwi [5,45]. Zidentyfikowano też wiele mikroDNA, które powstają wskutek stanów zapalnych, chorób autoimmunologicznych i neurodegeneracyjnych [53–55].

POZACHROMOSOMOWE DNA (ecDNA, DAWNIEJ DM)

Ta klasa kolistych pozachromosomowych DNA obejmuje jedno- i dwuniciowe elementy genetyczne o średniej wielkości 1–3 milionów par zasad [6]. Przeważnie zawierają onkogeny lub geny warunkujące lekooporność. Cząsteczki te ulegają autonomicznej replikacji podczas podziału komórki. Podczas fazy G1 cyklu komórkowego ecDNA gromadzą się na obrzeżach jądra, po czym przemieszczają się bliżej centrum, a następnie powielają się we wczesnej fazie S [6]. Dziedziczenie ecDNA odbywa się w sposób niemendlowski: komórki potomne przeważnie różnią się ich zawartością [4]. ecDNA często nie posiadają elementów odpowiedzialnych za hamowanie ekspresji zawartych w nich genów, co sprawia że mogą one być wyrażane konstytutywnie [1].

Cząsteczki należące do tej grupy odkryto w 1964 roku w metafazowych komórkach nerwiaka zarodkowego (neuroblastoma). Opisano je wówczas jako małe acentryczne dwuniciowe chromosomy (ang. *double minutes*, DM) [1,6]. Dalsze badania wykazały, że tego rodzaju cząsteczki mają związek z wieloma typami nowotworów – ich występowanie stwierdzono w 46% nowotworowych linii komórkowych [6]. Najczęściej zwiększona frekwencja ccDNA towarzyszy guzom mózgu, rakowi nadnercza, piersi, trzustki i płuc, natomiast rzadko bywają obserwowane w nowotworach jelita grubego i układu krwiotwórczego [2,6]. Mogą też powstawać w przebiegu innych chorób, które zaburzają stabilność genomu, takich jak anemia Fanconiego [1]. Należy przy tym podkreślić, że ecDNA nie są znajdowane wyłącznie w komórkach zmienionych chorobowo. Wiele z nich jest syntetyzowanych w zdrowych komórkach i tkankach [2,4].

Rozwój technik wysokoprzepustowego sekwencjonowania oraz nowoczesnych metod analizy cytogenetycznej umożliwił dokładniejszą charakterystykę tych cząsteczek. Ustalono, że w zdecydowanej większości występują one w formie jednoniciowej – dlatego w nowszych opracowaniach zaproponowano bardziej adekwatną nazwę tej grupy kolistych DNA. Dowiedziono też, że zasób znanych ecDNA (odnotowanych w ogólnodostępnych bazach sekwencji biologicznych) był mocno niedoszacowany [6].

Zawartość ecDNA w komórce jest pozytywnie skorelowana ze stopniem złośliwości nowotworu: wzrost liczby kopii ecDNA zwiększa ekspresję obecnego w nim onkogeny [6]. Zasadniczy wpływ na aktywność transkrypcyjną ecDNA ma również ich konformacja. Koliste cząsteczki DNA nie są tak ściśle ustrukturyzowane jak chromosomy. Co więcej, w przeciwieństwie do ich chromosomowych odpowiedników, nie oddziałują z histonami. Dlatego promotory zawarte w ecDNA są bardziej

podatne na interakcje z odległymi czynnikami wzmacniającymi transkrypcję, a nawet – z innymi onkogenami [2,4,6]. Przyjmuje się, że koliste pozachromosomowe DNA zwiększają zróżnicowanie genetyczne w obrębie guza i umożliwiają komórkom nowotworowym szybką proliferację oraz odpowiedź na zmieniające się warunki. Na przykład ecDNA EGRF czy MYC są odpowiedzialne za powstawanie przerzutów [4,56].

Wskazano kilka szlaków biogenezy ecDNA, takich jak mechanizm „pęknięcie-fuzja-most” (ang. *breakage fusion bridge*; BFB), który towarzyszy powstawaniu duplikacji odwróconych i złamań chromosomów w sąsiedztwie telomerów. Częsteczki te mogą też pojawiać się wskutek translokacji, delecji i amplifikacji czy katastrof chromosomalnych (ang. *chromothripsis*), które polegają na rozproszeniu jednego lub więcej chromosomów, a następnie rearanżacji powstałych fragmentów [6].

INNE KOLISTE POZACHROMOSOMOWE ELEMENTY GENETYCZNE

W genomach eukariotycznych odkryto również koliste DNA, których nie sposób jednoznacznie przypisać do którejś z powyższych kategorii. Najczęściej bywają one opisywane po prostu jako eccDNA (z odniesieniem do genomowego *locus*, z którego pochodzą). Istnieją też kategorie eccDNA specyficzne dla danej grupy organizmów.

Jednym z przykładów takich cząsteczek są pierścienie NR (zawierające wiele miejsc restrykcyjnych rozpoznawanych przez endonukleazę NlaIII; ang. *NlaIII repeat element*, *NR-element*). Częsteczki te odkryto w dzikich szczepach świdrowców *Trypanosoma brucei* (co ciekawe, referencyjny laboratoryjny szczep 927 zdaje się być ich pozbawiony). Elementy NR osiągają rozmiary pomiędzy 20 a 50 tysiącami par zasad. Składają się z niedokładnych bloków powtórzeń o długości 41, 40 i 32 par zasad. Prawdopodobnym źródłem tych sekwencji są powtórzenia o długości 29 bp zlokalizowane w rejonach subtelomerych chromosomów niosących geny zmiennych glikoprotein powierzchniowych. Pierścienie NR nie są stopniowo tracone w wyniku podziałów mitotycznych. Choć scharakteryzowano budowę tych cząsteczek, dotychczas nie poznano ich funkcji biologicznych [57].

Niedawno opisano też nowe koliste pozachromosomowe DNA, które znaleziono u orzęsków z rodzaju *Oxytricha*. Częsteczki te powstają w wyniku zaprogramowanych rearanżacji genomowych, zachodzących podczas tworzenia nowego jądra wegetatywnego. Pierścienie DNA u *Oxytricha* dzielą się na dwie zasadnicze klasy: cząsteczki zawierające sekwencje przypominające transpozony typu Tc1/mariner oraz cząsteczki pochodzące z niepowtarzalnych *loci* genomowych. Ustalono, że zidentyfikowane koliste DNA nie są jedynie produktami ubocznymi rearanżacji genomowych – znaczny odsetek pierścieni DNA okazał się być aktywny transkrypcyjnie [58].

Inne potencjalnie nowe dla nauki rodzaje kolistych pozachromosomowych DNA mogą się kryć w dotychczas niezbadanych lub słabo poznanych genomach eukariotycznych.

METODY BADANIA KOLISTYCH DNA

TECHNIKI MIKROSKOPOWE

Koliste cząsteczki DNA mogą być obserwowane za pośrednictwem metod mikroskopowych. W przypadku molekuł o relatywnie dużej masie cząsteczkowej (takich jak chloroplastowy DNA) możliwe jest wykorzystanie barwienia metodą Giemsa i prowadzenie obserwacji pod zwykłym mikroskopem świetlnym. Mniejsze cząsteczki mogą być uwidaczniane dzięki superrozdzielczym i wysokorozdzielczym technikom obrazowania optycznego (np. 3D-SIM). Z kolei wykorzystanie mikroskopii elektronowej – skaningowej (ang. *scanning electron microscopy*; SEM) i transmisyjnej (ang. *transmission electron microscopy*; TEM) pozwala wizualizować koliste DNA, których wielkość wykracza poza zdolność rozdzielczą tradycyjnych instrumentów [2,4,6].

ZAAWANSOWANE METODY OBRAZOWANIA

W badaniu kolistych DNA wykorzystuje się także fluorescencyjną hybrydyzację *in situ* (ang. *fluorescent in situ hybridization*; FISH). Polega ona na zastosowaniu wyznakowanych fluorescencyjnie sond, komplementarnych wobec poszukiwanych cząsteczek. Dzięki tej technice można śledzić frekwencję kolistych DNA o znanej sekwencji w czasie i przestrzeni [4-6].

Ostatnimi czasy opracowano również szereg innych protokołów eksperymentalnych, między innymi z zastosowaniem wizualizacji chromatyny z użyciem transpozazy Tn5 (ang. *assay of transposase-accessible chromatin with visualization*; ATAC-see) oraz cytometrii przepływowej [5].

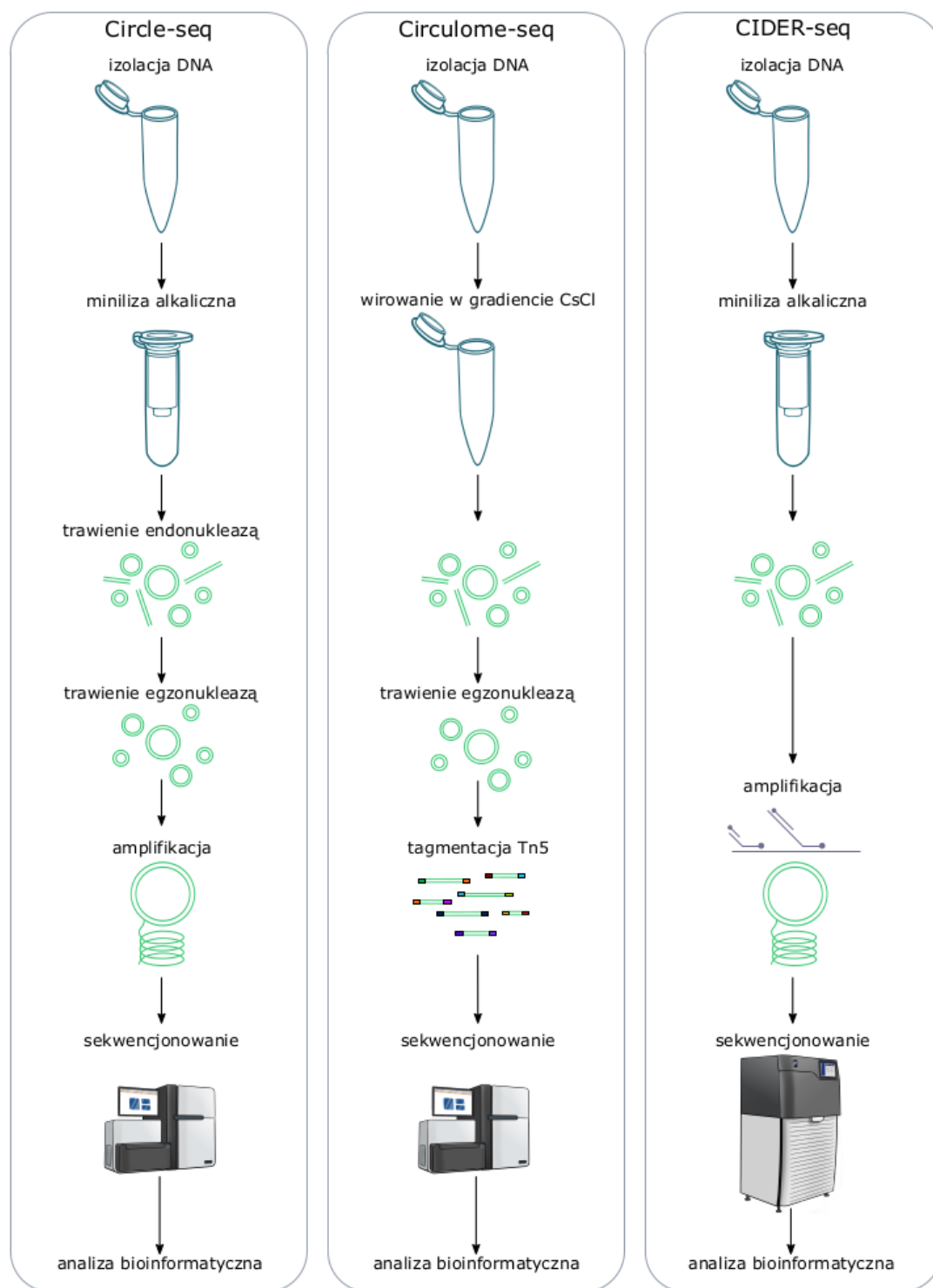
INNE METODY FRAKCJONOWANIA I ANALIZY KOLISTYCH DNA

Jednym z pierwszych sposobów fizycznej separacji kolistych i liniowych cząsteczek DNA było wirowanie w gradiencie chlorku cezu [4,5]. Technika ta ma jednak dość poważne ograniczenia. Sprawdza się w przypadku molekuł występujących w komórkach w dużej liczbie kopii, wymaga również przygotowania dość dużej ilości materiału wyjściowego. Dlatego z czasem została wyparta przez inne mniej czasochłonne i bardziej czułe metody z wykorzystaniem egzonukleaz selektywnie trawiących cząsteczki liniowe oraz zestawów odczynników do izolacji plazmidów [4,59-61].

Kolistą topologię cząsteczek o wielkości od 0,7 do 56,8 tysiąca par zasad można potwierdzić pośrednio za pomocą dwuwymiarowej elektroforezy w żelu agarozowym (2D). Pierścienie DNA bada się też z wykorzystaniem hybrydyzacji metodą Southerna i reakcji łańcuchowej polimerazy z odwrotnie zorientowanymi starterami (ang. *inverse polymerase chain reaction*; inverse PCR). Niestety techniki te zawodzą w przypadku eccDNA obecnych w komórkach w niewielu egzemplarzach. Nie nadają się też do poszukiwania nowych eccDNA w skali całego genomu. Ich zastosowanie obecnie ogranicza się raczej do potwierdzania konformacji wytypowanych, wcześniej wykrytych innymi metodami cząsteczek [4,34,62].

Koliste DNA mogą być badane w skali całego genomu z wykorzystaniem nowoczesnych technik wysokoprzepustowych: sekwencjonowania nowej generacji (Illumina) oraz sekwencjonowania trzeciej generacji (PacBio, Oxford Nanopore). Metody te zapewniają wgląd w szeroki wachlarz cząsteczek, z uwzględnieniem tych, które występują w komórkach w niewielkiej liczbie kopii [1,2,4,5,34,58,60].

Do zweryfikowanych i szeroko stosowanych metod eksperymentalnych należą protokoły znane jako Circle-seq, Circulome-seq oraz CIDER-seq, różniące się przede wszystkim sposobem przygotowania biblioteki do sekwencjonowania, wyborem platformy oraz zestawem narzędzi bioinformatycznych użytych do walidacji otrzymanych wyników (Ryc. 2) [34,58,60].

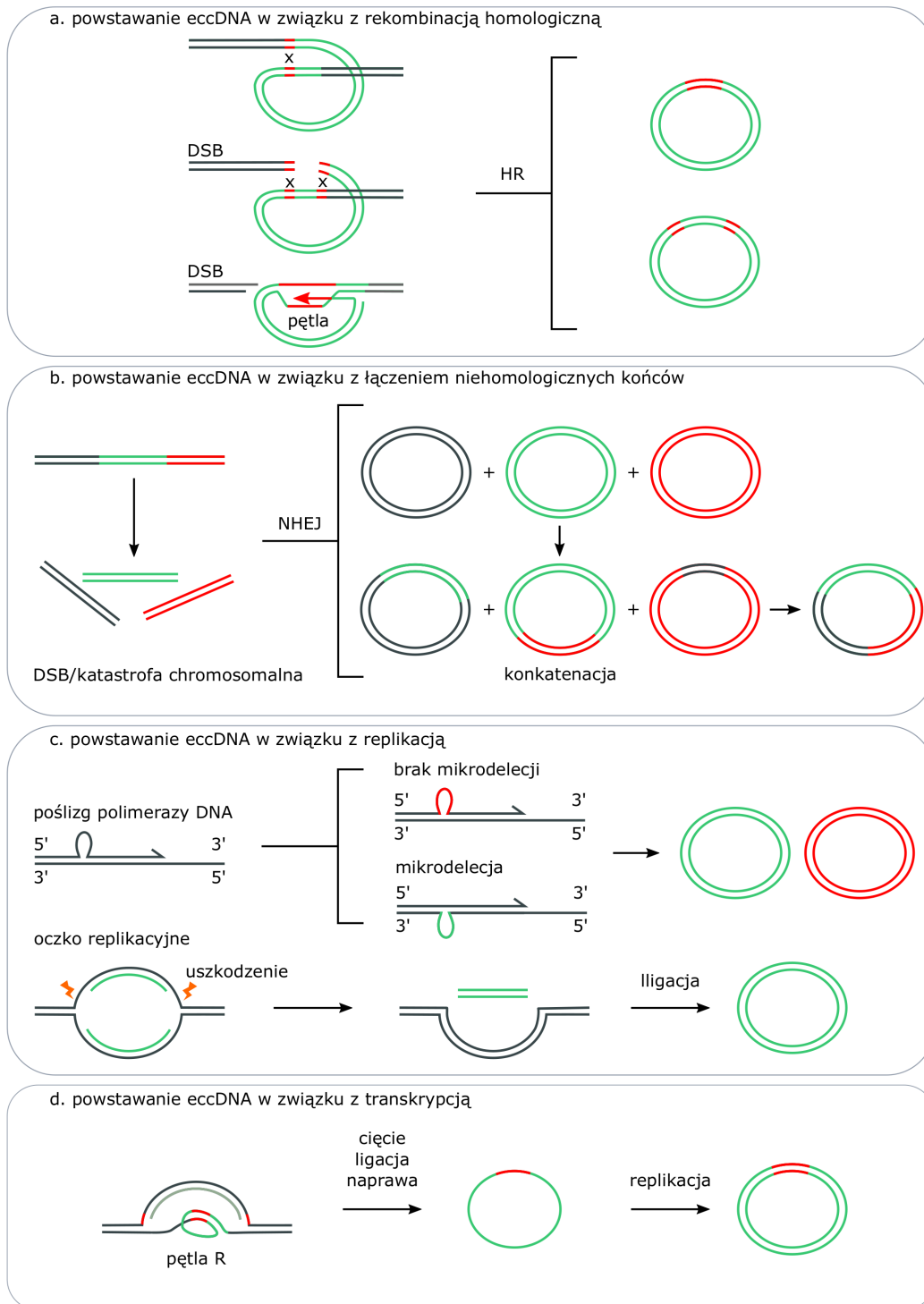


Rycina 2. Porównanie procedur wysokoprzepustowego sekwencjonowania: Circle-seq, Circulome-seq oraz CIDER-seq.

Circle-seq wykorzystywano między innymi do analizy repertuaru kolistych DNA w komórkach ludzkich oraz należących do drożdży i gołębi [34,51,61]. We wstępnych etapach procedury Circle-seq przeprowadza się minilę alkaliczną oraz trawienie enzymatyczne w celu usunięcia z preparatu cząsteczek liniowych. Manipulacje te wykonuje się kilkakrotnie, w zależności od typu badanej tkanki i/lub badanego organizmu. Circle-seq preferencyjnie pozwala

wychwycić potencjalne koliste DNA o rozmiarach od jednego do kilku tysięcy par zasad – większe pierścienie DNA mogą zostać pofragmentowane i usunięte lub zsekwencjonowane ze znacznie zmniejszonym pokryciem [34].

Circulome-seq posłużył między innymi w badaniu kolistych DNA u człowieka, nicienia *Ceanorhabditis elegans* i orzęsków z rodzaju *Oxytricha* [58,62]. W metodzie tej podczas przygotowania biblioteki do sekwencjonowania



Rycina 3. Główne rodzaje mechanizmów odpowiedzialnych za formowanie eccDNA: (a) tworzenie eccDNA poprzez naprawę homologiczną; (b) tworzenie eccDNA poprzez niehomologiczne łączenie końców DNA; (c) tworzenie eccDNA podczas replikacji; (d) tworzenie eccDNA w wyniku transkrypcji.

wykorzystuje się biochemiczne (trawienie egzonukleazą) i biofizyczne (wirowanie w gradiencie chlorku cezu) metody separacji cząsteczek o różnej topologii, co pozwala na uzyskanie mocno wzbogaconej frakcji kolistej. Circulome-seq umożliwia wykrywanie kolistych DNA o długości od kilkuset do kilkuset tysięcy par zasad [62].

CIDER-seq, w przeciwieństwie do dwóch wcześniej opisanych metod, opiera się na sekwencjonowaniu długich odczytów w czasie rzeczywistym – obejmujących pełne sekwencje analizowanych pierścieni DNA (PacBio, potencjalnie też Oxford Nanopore). Protokół ten może być stosowany do badania organizmów niemodelowych, których genomy referencyjne nie zostały jeszcze skorygowane i/lub w pełni zadnotowane. CIDER-seq był wykorzystywany między innymi w badaniach kolistych DNA u rzodkiewnika *Arabidopsis thaliana* [60].

BIOGENEZA KOLISTYCH POZACHROMOSOMOWYCH DNA

Chociaż wskazano szereg ścieżek prowadzących do powstawania kolistych pozachromosomowych DNA, mechanizmy biogenezy tych molekuł nie zostały jeszcze w pełni odkryte. Co ciekawe, większość z zaproponowanych szlaków syntezy kolistych DNA o pochodzeniu jądrowym ma związek z naprawą DNA [34,62]. Znaczny odsetek poznanych eccDNA zawiera powtórzenia albo wywodzi się z bogatych w nie rejonów genomu – co sugeruje, że w ich formowaniu mogą uczestniczyć mechanizmy naprawy wykorzystujące mikrohomologię. Niemniej spora część opisanych eccDNA nie zawiera powtórzeń, zatem nie może rekombinować w ten sposób z żadną sekwencją leżącą w pobliżu jej oryginalnych loci [2].

Zaproponowane ścieżki biosyntezy eccDNA ze względu na główną zasadę działania można podzielić na cztery kategorie mechanizmów związanych z: (I) rekombinacją homologiczną, (II) naprawą poprzez scalanie niehomologicznych końców DNA (III) replikacją DNA oraz (IV) transkrypcją (Ryc. 3) [4].

FUNKCJE KOLISTYCH POZACHROMOSOMOWYCH DNA

Spośród wszystkich kolistych DNA obecnych w komórce eukariotycznej, najdokładniej zbadane zostały genomy organelli półautonomicznych [8]. Również zasadnicza rola macierzy rDNA jest dobrze poznana, jednak w dalszym ciągu nie wiadomo dokładnie, jaka korzyść ewolucyjna płynie z posiadania rDNA^{circle} i dlaczego u niektórych gatunków taka konformacja jest domyślna [38]. Z kolei najmniej wiadomo o rolach, jakie odgrywają w komórkach inne koliste pozachromosomowe DNA o pochodzeniu jądrowym. Mimo że cząsteczki te są znane nauce od dekad, dopiero niedawno stały się obiektem wzmożonego zainteresowania badaczy [2].

Ze względu na zróżnicowanie liczby kopii poszczególnych eccDNA, ich potencjału transkrypcyjnego oraz możliwych oddziaływań z chromosomowym DNA, mogą one w istotny sposób kształtować zmienność genetyczną komórek

w poszczególnych tkankach. Jako czynniki warunkujące plastyczność genomu, eccDNA są zaangażowane w liczne zjawiska biologiczne [62].

U drożdży eccDNA pozwalają na szybkie zwielokrotnienie liczby kopii niektórych genów, co umożliwia adaptację do warunków ograniczonej dostępności składników odżywczych [63]. Liczne doniesienia potwierdzają też, że akumulacja kólek rDNA u drożdży towarzyszy starzeniu się komórek. W jednym z raportów zasugerowano również, że rDNA^{circle} mogą odgrywać rolę w kontrolowaniu jakości mitochondriów u drożdży, poprzez stymulowanie działania szlaku kontroli z udziałem antysensownych transkryptów [64]. Z kolei u roślin i niektórych mikroorganizmów jednokomórkowych, takich jak *Leishmania*, koliste pozachromosomowe DNA uczestniczą w nabywaniu oporności na herbicydy i leki [3,58].

Źródłem wielu eccDNA w komórkach ludzkich są gorące punkty aktywności rekombinacyjnej, które mogą obejmować rejony międzygenowe, całe geny lub ich fragmenty. Należą do nich między innymi geny kodujące rejony hiperzmiennie receptorów limfocytów T i łańcuchy lekkie immunoglobulin [58]. Wytwarzanie eccDNA następuje też podczas przełączania klas przeciwciał produkowanych przez limfocyty B. W wyniku tego procesu następuje wymiana części stałej łańcucha ciężkiego, zaś eccDNA jest produktem ubocznym rearanzacji genetycznych niezbędnych do wywołania swoistej odpowiedzi immunologicznej [1].

Z drugiej strony obecność określonych typów eccDNA może mieć związek z destabilizacją genomu, która często towarzyszy nowotworzeniu. Opisano wiele kolistych DNA, które napędzają amplifikację onkogenów [2]. W niektórych typach nowotworów produkcja eccDNA znacząco pogarsza rokowanie u pacjentów [4]. Postuluje się wykorzystanie określonych typów kolistych DNA jako biomarkerów w diagnostyce onkologicznej i ocenie postępów w leczeniu [2].

PIŚMIENNICTWO

1. Ain Q, Schmeer C, Wengerodt D, Witte OW, Kretz A (2020) Extrachromosomal circular DNA: current knowledge and implications for CNS aging and neurodegeneration. *Int J Mol Sci* 21(7): 2477
2. Paulsen T, Kumar P, Koseoglu MM, Dutta A (2018) Discoveries of extrachromosomal circles of DNA in normal and tumor cells. *Trends Genet* 34(4): 270-278
3. Nanić L, Ravlić S, Rubelj I (2016) Extrachromosomal DNA in genome (in)stability - role of telomeres. *Croat Chem Acta* 89(2): 175-181
4. Cao X, Wang S, Ge L, Zhang W, Huang J, Sun W (2021) Extrachromosomal circular DNA: category, biogenesis, recognition and functions. *Front Vet Sci* 8: 976-987.
5. Wang T, Zhang H, Zhou Y, Shi J (2021) Extrachromosomal circular DNA: a new potential role in cancer progression. *J Transl Med* 19(1): 257.
6. Liao Z, Jiang W, Ye L, Li T, Yu X, Liu L (2020) Classification of extrachromosomal circular DNA with a focus on the role of extrachromosomal DNA (eccDNA) in tumor heterogeneity and progression. *Biochim Biophys Acta Rev Cancer* 1874(1): 188392
7. Chinnery PF, Hudson G (2013) Mitochondrial genetics. *Br Med Bull* 106(1): 135-159
8. Smith DR, Keeling PJ (2015) Mitochondrial and plastid genome architecture: reoccurring themes, but significant differences at the extremes. *Proc Natl Acad Sci USA* 112(33): 10177-10184

9. Lavrov DV, Pett W (2016) Animal mitochondrial DNA as we do not know it: mt-genome organization and evolution in nonbilaterian lineages. *Genome Biol Evol* 8(9): 2896
10. Petersen J, Ludewig A, Michael V, Bunk B, Jarek M, Baurain D, Brinkmann H (2014) *Chromera velia*, endosymbioses and the rhodoplex hypothesis—plastid evolution in cryptophytes, alveolates, stramenopiles, and haptophytes (CASH lineages). *Genome Biol Evol* 6(3): 666-684
11. Lukeš J, Wheeler R, Jirsová D, David V, Archibald JM (2018) Massive mitochondrial DNA content in diplomemid and kinetoplastid protists. *IUBMB Life* 70(12): 1267-1274
12. Gray MW, Lang BF, Burger G (2004) Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet* 38(1): 477-524
13. Nosek J, Tomáška L (2003) Mitochondrial genome diversity: evolution of the molecular architecture and replication strategy. *Curr Genet* 44(2): 73-84
14. Faktorová D, Dobáková E, Peña-Díaz P, Lukeš J (2016) From simple to supercomplex: mitochondrial genomes of euglenozoan protists. *F1000Res* 5: 392
15. Valach M, Moreira S, Hoffmann S, Stadler PF, Burger G (2017) Keeping it complicated: mitochondrial genome plasticity across diplomemids. *Sci Rep* 7(1): 14166
16. Burger G, Valach M (2018) Perfection of eccentricity: mitochondrial genomes of diplomemids. *IUBMB Life* 70(12): 1197-1206
17. Lang BF, Burger G, O'Kelly CJ, Cedergren R, Golding GB, Lemieux C, Sankoff D, Turmel M, Gray MW (1997) An ancestral mitochondrial DNA resembling a eubacterial genome in miniature. *Nature* 387(6632): 493-497
18. Chan DC (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell* 125(7): 1241-1252
19. Luo S, Valencia AC, Zhang J, Lee NC, Slone J, Gui B, Wang X, Li Z, Dell S, Brown J, Chen SM, Chien YH, Hwu WL, Fan PC, Wong LJ, Atwal PS, Huang T (2018) Biparental inheritance of mitochondrial DNA in humans. *Proc Natl Acad Sci* 115(51): 13039-13044
20. Lukeš J, Guilbride DL, Votýpka J, Zíková A, Benne R, Englund PT (2002) Kinetoplast DNA network: evolution of an improbable structure. *Eukaryot Cell* 1(4): 495-502
21. Roy J, Faktorová D, Lukeš J, Burger G (2007) Unusual mitochondrial genome structures throughout the Euglenozoa. *Protist* 158(3): 385-396
22. Green BR (2011) Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes. *Plant J* 66(1): 34-44
23. Bodyl A, Stiller JW, Mackiewicz P (2009) Chromalveolate plastids: direct descent or multiple endosymbioses? *Trends Ecol* 24(3): 119-121
24. Lin Z, Zhou P, Ma X, Liao Z, Li R, Ming R (2020) Comparative analysis of chloroplast genomes in *Vasconcellea pubescens* and *Carica papaya*. *Sci Reports* 10(10): 1-12
25. Daniell H, Lin CS, Yu M, Chang WJ (2016) Chloroplast genomes: diversity, evolution, and applications in genetic engineering. *Genome Biol* 17(1): 134
26. Jiao Y, Guo H, (2014) Prehistory of the angiosperms: characterization of the ancient genomes. *Adv Bot Res* 69: 223-245
27. Koumandou VL, Wickstead B, Ginger ML, van der Giezen M, Dacks JB, Field MC (2013) Molecular paleontology and complexity in the last eukaryotic common ancestor. *Crit Rev Biochem Mol. Biol* 48(4): 373-396
28. Barbrook AC, Voolstra CR, Howe CJ (2014) The chloroplast genome of a *Symbiodinium* sp. clade C3 isolate. *Protist* 165(1): 1-13
29. Zhu A, Guo W, Gupta S, Fan W, Mower JP (2016) Evolutionary dynamics of the plastid inverted repeat: the effects of expansion, contraction, and loss on substitution rates. *New Phytol* 209(4): 1747-1756
30. Jansen RK, Ruhlman TA (2012) Plastid genomes of seed plants. *Adv Photos Res* 35: 103-126
31. Lemieux C, Otis C, Turmel M (2014) Six newly sequenced chloroplast genomes from prasinophyte green algae provide insights into the relationships among prasinophyte lineages and the diversity of streamlined genome architecture in picoplanktonic species. *BMC Genomics* 15(1): 857
32. Molina J, Hazzouri KM, Nickrent D, Geisler M, Meyer RS, Pentony MM, Flowers JM, Pelsler P, Barcelona J, Inovejas SA, Uy I, Yuan W, Wilkins O, Michael CI, Locklear S, Concepcion GP, Purugganan MD (2014) Possible loss of the chloroplast genome in the parasitic flowering plant *Rafflesia lagascae* (Rafflesiaceae). *Mol Biol Evol* 31(4): 793-803
33. Lanciano S, Carpentier MC, Llauro C, Jobet E, Robakowska-Hyzorek D, Lasserre E, Ghesquière A, Panaud O, Mirouze M (2017) Sequencing the extrachromosomal circular mobilome reveals retrotransposon activity in plants. *PLoS Genet* 13(2): 1-20
34. Møller HD, Parsons L, Jørgensen TS, Botstein D, Regenberg B (2015) Extrachromosomal circular DNA is common in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* 112(24): E3114-E3122
35. Gerbi SA (1986). The evolution of eukaryotic ribosomal DNA. *Biosystems* 19(4): 247-258
36. Gregory RT (2005) Genome size evolution in animals. *Genome Biol Evol* 1: 3-87
37. Ravel-Chapuis P, Nicolas P, Nigon V, Neyret O, Freyssinet G (1985) Extrachromosomal circular nuclear rDNA in *Euglena gracilis*. *Nucl Acids Res* 13(20): 7529-7537
38. Torres-Machorro AL, Hernández R, Cevallos AM, López-Villaseñor I (2010) Ribosomal RNA genes in eukaryotic microorganisms: witnesses of phylogeny? *FEMS Microbiol Rev* 34(1): 59-86
39. Sinclair DA, Guarente L (1997) Extrachromosomal rDNA circles - a cause of aging in yeast. *Cell* 91(7): 1033-1042
40. Panigrahi SK, Jhingan GD, Som I, Bhattacharya A, Petri WA, Bhattacharya S (2009) Promoter analysis of palindromic transcription units in the ribosomal DNA circle of *Entamoeba histolytica*. *Eukaryot. Cell* 8(1): 69-76
41. Nguyen BT, Chapman NM, Tracy S, Drescher KM (2021) The extrachromosomal elements of the *Naegleria* genus: how little we know, *Plasmid* 115: 102567
42. McWatters DC, Russell AG (2017) *Euglena* transcript processing. *Adv Exp Med Biol* 979: 141-158.
43. Greenwood SJ, Schnare MN, Cook JR, Gray MW (2001) Analysis of intergenic spacer transcripts suggests 'read-around' transcription of the extrachromosomal circular rDNA in *Euglena gracilis*. *Nucl Acids Res* 29(10): 2191-2198
44. Kim YH, Ishikawa D, Ha HP, Sugiyama M, Kaneko Y, Harashima S (2006) Chromosome XII context is important for rDNA function in yeast. *Nucl Acids Res* 34(10): 2914-2924
45. Prada-Luengo I, Krogh A, Maretty L, Regenberg B (2019) Sensitive detection of circular DNAs at single-nucleotide resolution using guided realignment of partially aligned reads. *BMC Bioinformatics* 20(1): 663
46. Mazzucco G, Huda A, Galli M, Piccini D, Giannattasio M, Pessina F, Doksani Y (2020) Telomere damage induces internal loops that generate telomeric circles. *Nat Commun* 11(1): 5297
47. Henson JD, Reddel RR (2010) Assaying and investigating alternative lengthening of telomeres activity in human cells and cancers, *FEBS Lett* 584(17): 3800-3811
48. Tomáška L, Nosek J, Kramara J, Griffith JD (2009) Telomeric circles: universal players in telomere maintenance? *Nat Struct Mol Biol* 16(10): 1010-1015
49. Krolewski JJ, Schindler CW, Rush MG (1984) Structure of extrachromosomal circular DNAs containing both the Alu family of dispersed repetitive sequences and other regions of chromosomal DNA. *J Mol Biol* 174(1): 41-54
50. Dillon LW, Kumar P, Shibata Y, Wang YH, Willcox S, Griffith JD, Pommer Y, Takeda S, Dutta A (2015) Production of extrachromosomal microDNAs is linked to mismatch repair pathways and transcriptional activity. *Cell Rep* 11(11): 1749-1759
51. Paulsen T, Shibata Y, Kumar P, Dillon L, Dutta A (2019) Small extrachromosomal circular DNAs, microDNA, produce short regulatory RNAs that suppress gene expression independent of canonical promoters. *Nucl Acids Res* 47(9): 4586-4596
52. Zmysłowska A, Stańczyk M, Nowicka Z, Waszczykowska A, Barańska D, Fendler W, Borowiec M, Młynarski W (2020) Serum microRNA

- as indicators of Wolfram syndrome's progression in neuroimaging studies. *BMJ Open Diab Res Care* 8(2): e001379
53. Assmann TS, Recamonde-Mendoza M, De Souza BM, Crispim D (2017) MicroRNA expression profiles and type 1 diabetes mellitus: systematic review and bioinformatic analysis. *Endocr Connect* 6(8): 773-790
 54. Lee A, Kim SN (2020) Serum MicroRNA on inflammation: a literature review of mouse model studies. *Biomarkers* 25(7): 513-524
 55. Verhaak RGW, Bafna V, Mischel PS (2019) Extrachromosomal oncogene amplification in tumor pathogenesis and evolution. *Nat Rev Cancer* 19(5): 283
 56. Alford NS, Navarro M, Jamnadass HR, Dunbar H, Ackroyd M, Murphy NB, Gull K, Ersfeld K (2003) The identification of circular extrachromosomal DNA in the nuclear genome of *Trypanosoma brucei*. *Mol Microbiol* 47(2): 277-289
 57. Yerlici VT, Lu MW, Hoge CR, Miller RV, Neme R, Khurana JS, Bracht JR, Landweber LF (2019) Programmed genome rearrangements in *Oxytricha* produce transcriptionally active extrachromosomal circular DNA. *Nucl Acids Res* 47(18): 9741-9760
 58. Møller HD, Bojsen RK, Tachibana C, Parsons L, Botstein D, Regenberg B (2016) Genome-wide purification of extrachromosomal circular DNA from eukaryotic cells. *J Vis Exp* 4(110): e54239
 59. Mehta D, Cornet L, Hirsch-Hoffmann M, Zaidi SA, Vanderschuren H (2020) Full-length sequencing of circular DNA viruses and extrachromosomal circular DNA using CIDER-Seq. *Nat Protoc* 15: 1673-1689
 60. Shoura MJ, Gabdank I, Hansen L, Merker J, Gotlib J, Levene SD, Fire AZ (2017) Intricate and cell-type-specific populations of endogenous circular DNA (eccDNA) in *Caenorhabditis elegans* and *Homo sapiens*. *G3: Genes Genom Genet* 7(10): 3295-3303
 61. Hull RM, Houseley J (2020) The adaptive potential of circular DNA accumulation in ageing cells. *Curr Genet* 66: 889-894
 62. Møller HD, Ramos-Madriral J, Prada-Luengo I, Gilbert MTP, Regenberg B (2020) Near-random distribution of chromosome-derived circular DNA in the condensed genome of pigeons and the larger, more repeat-rich human genome. *Genome Biol Evol* 12(1): 3762-3777
 63. Poole AM, Kobayashi T, Ganley ARD (2012) A positive role for yeast extrachromosomal rDNA circles? Extrachromosomal ribosomal DNA circle accumulation during the retrograde response may suppress mitochondrial cheats in yeast through the action of TAR1. *Bioessays* 34(9): 725-729
 64. Laffitte MCN, Genoio MM, Mukherjee A, Légaré D, Masson JY, Ouellette M (2014) Formation of linear amplicons with inverted duplications in *Leishmania* requires the MRE11 nuclease. *PLoS Genet* 10(12): 21-23

Types of circular DNA in Eukarya

Natalia Gumińska, PhD^{1,2}✉, Rafał Milanowski, PhD²

¹Laboratory of RNA Biology, International Institute of Molecular and Cell Biology in Warsaw

²Institute of Evolutionary Biology, Faculty of Biology, University of Warsaw Biological and Chemical Research Centre, University of Warsaw

✉corresponding author: nguminska@iimcb.gov.pl

Keywords: circulome, circular DNA, DNA repair, extrachromosomal DNA, genome plasticity

ABSTRACT

In eukaryotic cells, DNA occurs mainly in a linear chromosomes. In addition, it can also take the form of circular molecules. Mitochondrial and chloroplast genomes are the most thoroughly studied circular DNAs. However, the repertoire of circular DNA in Eukarya is much broader. It also includes extrachromosomal circular DNA (eccDNA): circular forms of rDNA, telomeric circles, small polydisperse DNA, microDNA, and other types of eccDNA of nuclear origin. The occurrence of eccDNA has been confirmed in all organisms tested so far. Previous studies have shown that some eccDNAs are present at every stage of the cell cycle, while others appear and/or accumulate under specific circumstances. It has been proven that eccDNA accumulation accompanies severe genome destabilization caused by malignancies or stress conditions. Despite growing interest in eccDNA, they remain a poorly understood component of eukaryotic genomes. Still little is known about the mechanisms of their formation, evolution and biological functions.

