KOSMOS
PROBLEMY NAUK BIOLOGICZNYCH

Tom 67 2018
Numer 3 (320)
Strony 661–673

Polskie Towarzystwo Przyrodników im. Kopernika

KATARZYNA SIDORCZUK, PAWEŁ MACKIEWICZ, PRZEMYSŁAW GAGAT

Zakład Genomiki
Wydział Biotechnologii
Uniwersytet Wrocławski
Fryderyka Joliot-Curie 14A, 50-383 Wrocław
E-mail: przemyslaw.gagat@uwr.edu.pl

PAULINELLA CHROMATOPHORA – NIEZWYKŁA FOTOSYNTETYCZNA PRZYGODA AMEBY I SINICY

ENDOSYMBIOZA I NARODZINY PLASTYDÓW ROŚLIN

Około 1,5 miliarda lat temu miało miejsce niezwykłe wydarzenie, które na zawsze odmieniło bieg ewolucji życia na naszej planecie. Było nim pochłonięcie i przekształcenie na drodze endosymbiozy sinicy w organellum komórkowe, tzw. plastyd, przez jednokomórkowego, heterotroficznego eukarionta (YOON i współaut. 2004, PARFREY i współaut. 2011, ZIMORSKI i współaut. 2014). Endosymbioza sinicy doprowadziła do wykształcenia komórki fotosyntetycznej, tj. zdolnej do odżywiania się z wykorzystaniem światła słonecznego. Komórka ta z czasem uległa zróżnicowaniu na trzy linie rozwojowe: glaukofity (Glaucophyta), krasnorosty (Rhodophyta) i rośliny zielone wraz z zielenicami (Viridiplantae), które łącznie tworzą supergrupę zwaną Archaeplastida (DE CLERCK i współaut. 2012, LÖFFELHARDT 2014, MACKIEWICZ i GAGAT 2014).

Zanim doszło jednak do wykształcenia relacji endosymbiontycznej, związek sinicy i jej przyszłego gospodarza miał najprawdopodobniej charakter typu drapieżnik-ofiara. Pochłaniane na drodze fagocytozy sinice ulegały trawieniu w pęcherzykach fagosomalnych, tak jak to dziś obserwujemy u niektórych jednokomórkowych glonów spokrewnionych z roślinami, zwanych prazynofitami (Prasinophyceae), które wciąż zachowały zdolność do fagocytozy, np. *Cymbomonas tetramitiformis* (MOESTRUP i współaut. 2003, MARUYAMA i KIM 2013, GAGAT i MACKIEWICZ 2017). Rozwój relacji endosymbiontycznej wymagał zahamowania trawienia endosymbiontów wewnątrz fagosomów (BODYŁ i współaut. 2009) oraz wykształcenia powiązania metabolicznego (KARKAR i współaut. 2015), które zapewniłoby presję selekcyjną do pogłębiania relacji endosymbiontycznej. Zgodnie z możliwym scenariuszem endosymbiozy, tzw. hipotezą „ménage à trois" („trójkąta małżeńskiego"), bakterie zwane chlamydiami odegrały kluczową rolę w endosymbiozie sinicy (BALL i współaut. 2013, 2016; DESCHAMPS 2014). Białka efektorowe wydzielane przez chlamydie mogły nie tylko utrudniać fuzję fagosomów z lizosomami, ale także zapoczątkować integrację metaboliczną poprzez reorganizację szlaku syntezy glikogenu gospodarza. Sekrecja, a następnie transfer chlamydiowych genów, kodujących białka takie jak pirofosforylazę ADP-glukozy oraz fosforylazę i syntazę glikogenu, miał umożliwić wykorzystanie sinicowego produktu fotosyntezy, tj. ADP-glukozy. Normalnie ADP-glukoza jest niedostępna dla eukariontów, które jako substratu do syntezy glikogenu używają UDP-glukozy (BALL i współaut. 2013).

Przekształcenie sinicowego endosymbionta w plastyd, poza zahamowaniem trawienia i zacieśnieniem więzów metabolicznych, wymagało także dopasowania na poziomie genetycznym i białkowym obu partnerów. Związane to było z trzema kluczowymi procesami, które nieodzownie towarzyszą przemianie endosymbionta w organellum komórkowe: (i) przeniesieniem genów z genomu endosymbionta do genomu jądrowego go-

Słowa kluczowe: chromatofor, endosymbioza, ewolucja, *Paulinella*, plastyd, sinica, transport

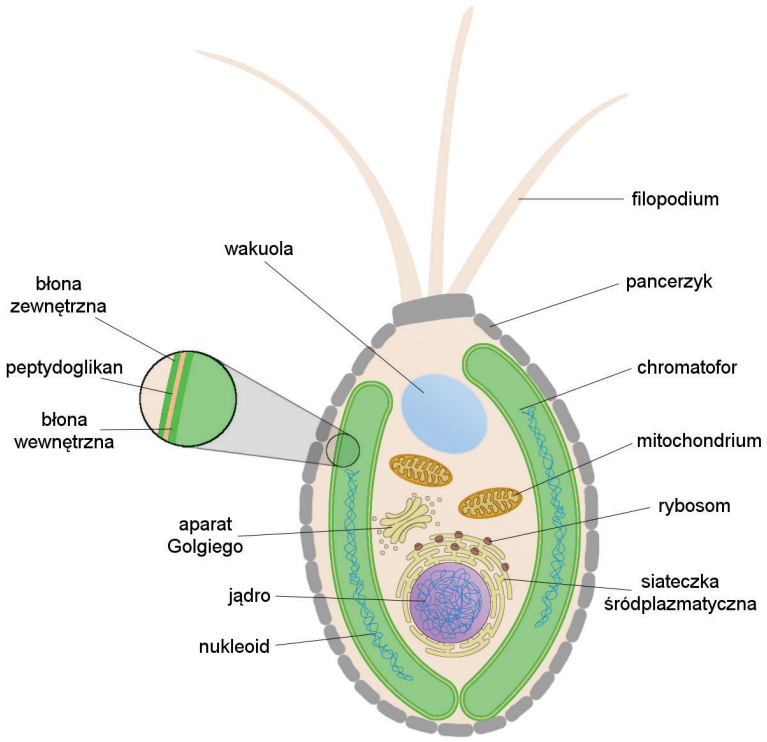
spodarza (tzw. endosymbiotycznym transferem genów ETG), (ii) ewolucją w błonach endosymbionta systemu importu dla białek kodowanych przez geny jądrowe gospodarza oraz (iii) wykształceniem się odpowiednich sekwencji kierujących w białkach kodowanych jądrowo importowanych do endosymbionta (CAVALIER-SMITH i LEE 1985; BODYŁ i współaut. 2009; GROSS i BHATTACHARYA 2009). Skalę tych procesów odzwierciedlają obecne plastydy roślin, ponieważ ich zredukowany genom koduje zaledwie od 60 do 200 różnych białek (GREEN 2011), podczas gdy organella te wymagają ponad 2000 białek do właściwego funkcjonowania (Tabela 1) (RICHLY i LEISTER 2004, VAN WIJK 2004). Genomy przodków współczesnych plastydów mogły kodować nawet 3000 białek, podobnie jak zsekwencjonowany genom najbliżej z nimi spokrewnionej sinicy *Gloeomargarita lithophora* (PONCE-TOLEDO i współaut. 2017).

Zakładając endosymbiozę na drodze fagocytozy, sinicowy przodek plastydów roślin musiał być początkowo otoczony trzema błonami: zewnętrzną fagosomalną i dwiema bakteryjnymi (BODYŁ i współaut. 2009). Ze względu na fakt, iż współczesne plastydy roślin mają jedynie dwie błony, jedna z trzech musiała zostać utracona w czasie ewolucji. Aby odpowiedzieć na pytanie, która błona zanikła, najlepiej jest przyjrzeć się plastydom (cyjanellom) jednokomórkowych glonów zwanych glaukofitami (JACKSON i współaut. 2015). W ich przestrzeni międzybłonowej wciąż można odnaleźć warstwę peptydoglikanu, białkowo-cukrowego biopolimeru będącego pozostałością dawnej ściany sinicy (PFANZAGL i współaut. 1996). Warstwa ta przylega do błony wewnętrznej cyjanelli, a jej obecność pomiędzy błonami sugeruje, że doszło do utraty błony fagosomalnej lub zewnętrznej błony sinicy. Trudność w identyfikacji, która błona (fagosomalna czy zewnętrzna błona sinicy) została utracona, jest spowodowana niejednolitą (chimeryczną) naturą zewnętrznej błony plastydów. Zawiera ona bowiem zarówno związki pochodzenia eukariotycznego (np. fosfatydylocholinę), jak i prokariotycznego (np. galaktolipidy, białka typu β-baryłki). Obecnie zakłada się, iż zewnętrzna błona plastydów ma pochodzenie sinicowe, a komponenty eukariotyczne zostały nabyte podczas ucieczki endosymbionta z fagosomu i przebijania się przez jego błonę do cytoplazmy w wyniku nieskoordynowanego podziału endosymbionta i fagosomu (BODYŁ i współaut. 2009). Tak powstała błona zewnętrzna mogła systematycznie łączyć się z pęcherzykami gospodarza i utrzymywać swój chimeryczny skład. Obecnie błona ciągle posiada taki skład w wyniku procesów syntezy obu typów związków.

Powszechnie uważa się, że zdarzenia endosymbiotyczne (w szczególności endosymbioza prokarionta) są bardzo rzadkimi procesami ewolucyjnymi (KEELING 2010, MACKIEWICZ i współaut. 2012b), ponieważ przekształcenie endosymbionta w organellum komórkowe jest procesem bardzo skomplikowanym. Po pierwsze, wymaga wykształcenia w błonach endosymbionta systemu importu dla białek kodowanych jądrowo, po drugie, wyposażenia każdego białka, które ma być importowane do endosymbionta (przyszłego organellum komórkowego) w odpowiednią sekwencję kierującą, która byłaby przez ten system rozpoznawana (CAVALIER-SMITH i LEE 1985). Hipoteza ta, zaproponowana przez Cavalier-Smitha około 30 lat temu, stała się paradygmatem nauk ewolucyjnych (CAVALIER-SMITH i LEE 1985). Obecnie rośnie liczba argumentów podważających tę hipotezę (MACKIEWICZ i współaut. 2012b, GAGAT i współaut. 2016). Okazuje się bowiem, że ewolucja mechanizmu importu białek w plastydach nie musi być wcale zdarzeniem jednostkowym i niepowtarzalnym, ponieważ taki system importu może wyewoluować za pomocą stopniowych modyfikacji już istniejących komponentów, bez konieczności tworzenia wszystkiego od nowa (BODYŁ i współaut. 2009). Najważniejszym argumentem potwierdzającym ten punkt widzenia jest fakt, iż proces endosymbiozy sinicy nastąpił co najmniej dwa razy: około 1,5 miliarda lat temu doprowadzając do powstania plastydów roślin oraz stosunkowo niedawno u ameby *Paulinella chromatophora* (MACKIEWICZ i współaut. 2012b, GAGAT i współaut. 2016).

PAULINELLA CHROMATOPHORA – NIEDAWNY NABYWCA ENDOSYMBIONTYCZNYCH SINIC

Paulinella chromatophora (Ryc. 1) jest fotosyntetyczną amebą należącą do supergrupy Rhizaria (YOON i współaut. 2009). Została odkryta przez niemieckiego biologa Roberta Lauterborna pod koniec XIX w. w materiale pobranym ze starego koryta rzeki Ren w wigilię Bożego Narodzenia, jako niezwykły prezent dla badaczy endosymbiozy (MELKONIAN i MOLLENHAUER 2005). *P. chromatophora* występuje powszechnie w słodkich, czasem słonawych zbiornikach wodnych na całym świecie. Preferuje zaciemnione osady, bogate w związki organiczne, o zwiększonym zasoleniu i stosunkowo niskim pH (MELKONIAN i SUREK 2009, NOWACK 2014). Komórki *Paulinella* otoczone są owalnym, przezroczystym pancerzykiem zbudowanym z krzemionkowych płytek, z charakterystycznym otworem dla pseudopodiów, za pomocą których ameba przemieszcza się po dnie zbiorników

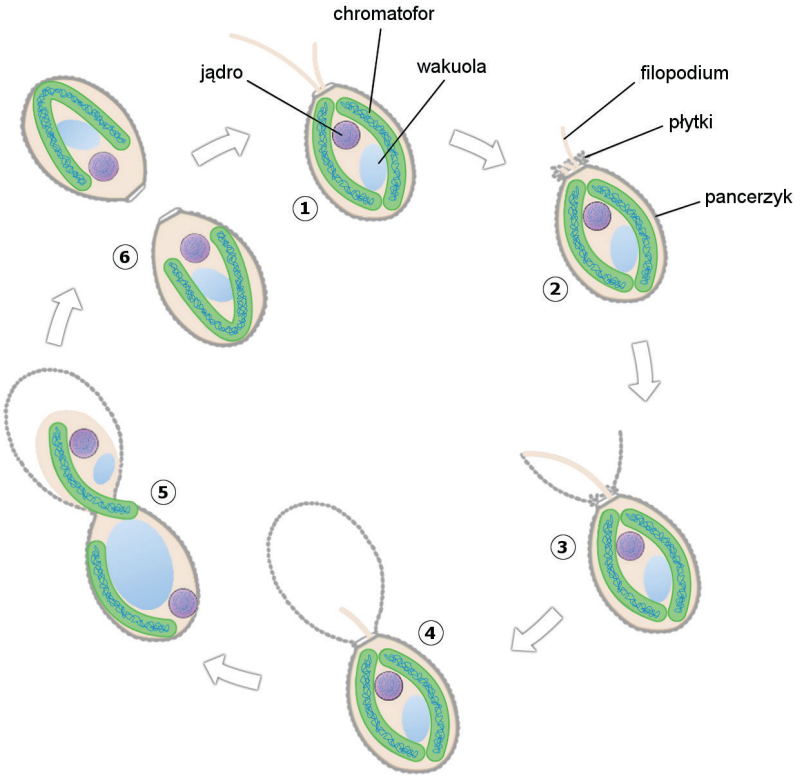


Ryc. 1. Schemat budowy *P. chromatophora*.
Komórka otoczona jest pancerzykiem z krzemionkowych płytek. Z otworu pancerzyka wyłaniają się filopodia umożliwiające poruszanie się. Istotnymi elementami komórki są chromatofory pochodzenia sinicowego otoczone dwiema błonami, pomiędzy którymi znajduje się warstwa peptydoglikanu. Chromatofory posiadają własny materiał genetyczny w postaci nukleoidu.

wodnych (NOWACK 2014). Do niedawna znane były tylko dwa fotosyntetyczne szczepy *P. chromatophora*: FK01 wyizolowany w Japonii (YOON i współaut. 2009) i M0880/a odkryty w Niemczech, z którego izolatu powstała hodowla CCAC 0185 (NOWACK i współaut. 2008). Szczepy te różnią się między innymi wielkością (FK01 jest mniejszy: 17 x 11 µm, CCAC 0185: 27 x 20 µm), liczbą przypadających na kolumnę płytek pancerzyka (FK01: 10-11, CCAC 0185: 12-14) oraz liczbą płytek wokół otworu gębowego (FK01: 5, CCAC 0185: 3) (YOON i współaut. 2009).

Najbardziej niezwykłe i wyjątkowe w komórkach *P. chromatophora* są dwa ciałka fotosyntetyczne – chromatofory, które umożliwiają tej amebie odżywianie się na drodze fotoautotroficznej. Zostały one nabyte, podobnie jak plastydy roślin, w wyniku endosymbiozy sinicy (MARIN i współaut. 2005), jednak w przeciwieństwie do plastydów wyewoluowały stosunkowo niedawno, około 90-140 milionów lat temu (DELAYE i współaut. 2016). O ich niezależnym nabyciu od plastydów roślin świadczy także fakt, iż geny chromatoforów *Paulinella* grupują się na drzewach filogenetycznych z homologicznymi genami α-sinic, do których należą *Prochlorococcus*, *Synechococcus* i *Cyanobium*, natomiast geny plastydów roślin wykazują bliskie związki z genami β-sinic (np. *Gloeomargarita lithophora*) (MARIN i współaut. 2005, GAGAT i MACKIEWICZ 2014, PONCE-TOLEDO i współaut. 2017). W przeciwieństwie do wolno żyjących *Synechococcus* spp. o kształcie pałeczkowatym, chromatofory *Paulinella* są większe i nieco wygięte (NOWACK 2014). Podobnie jak plastydy roślin, są one bardzo silnie zintegrowane z komórką gospodarza i niezdolne do samodzielnego życia. Ich podział jest zsynchronizowany z podziałem komórki gospodarza (Ryc. 2), a między chromatoforem i cytozolem gospodarza zachodzi wymiana metabolitów (KIES 1974, KIES i KREMER 1979, MARIN i współaut. 2005, NOWACK i współaut. 2008, NOMURA i współaut. 2014). Pod względem budowy, chromatofory najbardziej przypominają cyjanelle glaukofitów, ponieważ wciąż posiadają warstwę peptydoglikanu pomiędzy zewnętrzną a wewnętrzną błoną chromatoforu (PFANZAGL i współaut. 1996).

Najnowsze badania ukazują dużą różnorodność gatunków *Paulinella*, zarówno heterotroficznych (10 gatunków), które żywią się sinicami i zamieszkują jedynie środowisko morskie (NICHOLLS 2009, KIM i PARK 2016), jak i fotoautotroficznych opisanych poniżej. Przykładowo, w Korei odkryto nowy szczep KR01 charakteryzujący się mniejszym rozmiarem (13×10 µm) i zredukowaną liczbą płytek przypadającą na kolumnę pancerzyka (8–9), w porównaniu z pozostałymi fotosyntetycznymi szczepami *Paulinella* (LHEE i współaut. 2017). Ponadto, KR01 ma 5 płytek wokół otworu gębowego, podobnie jak *P. chromatophora* FK01. Analiza sekwencji genomu chromatoforów szczepu KR01 wykazała duże podobieństwo do genomu szczepu FK01. Ponieważ FK01 i KR01 istotnie różnią się od CCAC 0185, zaproponowano dla nich nową nazwę *Paulinella micropora* (LHEE i współaut. 2017). Co więcej, na piaszczystych równinach wschodniego wybrzeża Korei został odkryty kolejny gatunek fotosyntetyczny – *Pau-*



Ryc. 2. Podział komórki *P. chromatophora*.
Paulinella cechuje podział komórki unikatowy dla przedstawicieli rzędu *Euglyphida*. Przed podziałem (1) komórka macierzysta wytwarza nowy pancerzyk z krzemionkowych płytek produkowanych w wakuolach cytoplazmatycznych. Nowo wytworzone płytki są wydzielane przez otwór w pancerzyku i gromadzone wokół niego (2). Następnie grube filopodium pojedynczo wykłada płytki w odpowiednie miejsca nowotworzonego pancerzyka tak, by jego otwór był zwrócony w stronę komórki macierzystej (3). Po ułożeniu płytek filopodium wycofuje się do komórki (4) i prawdopodobnie wtedy następuje podział komórki. Jedna z komórek potomnych zawierająca jeden chromatofor jest przeciskana przez otwór do nowego pancerzyka, jednocześnie wakuola komórki pozostającej w pancerzyku gwałtownie zwiększa swoją objętość, przez co ułatwia zapewne przepychanie cytozolu z zawartością do nowej komórki (5). Po podziale komórki, chromatofory wydłużają się i zakrzywiają przyjmując charakterystyczny kształt podkowy (6), następuje ich podział na dwa chromatofory, które przyjmują kształt początkowy (1) (NOMURA i współaut. 2014).

linella longichromatophora (KIM i PARK 2016). Ameba ta charakteryzuje się większym rozmiarem od pozostałych (35×19 µm) oraz dłuższymi chromatoforami o kształcie litery „U". Na drzewach filogenetycznych opartych o sekwencje chromatoforowego i jądrowego rRNA, *P. longichromatophora* grupuje się razem z *P. micropora*, a *P. chromatophora* stanowi osobną linię (KIM i PARK 2016, LHEE i współaut. 2017). *P. chromatophora* CCAC 0185 i *P. micropora* (FK01 i KR01) bytują w wodach słodkich, podobnie jak ich przodek, a *P. longichromatophora* najprawdopodobniej wtórnie powróciła do morza (KIM i PARK 2016, GAGAT i MACKIEWICZ 2017).

Zgodnie z definicją sformułowaną przez CAVALIER-SMITHA i LEE (1985), endosymbiont powinien zawierać wszystkie geny kodujące białka niezbędne do jego funkcjonowania, a organellum komórkowe tylko niewielką ich liczbę, gdyż są one dostarczane przez gospodarza. Większość białek znajdująca się w organellach komórkowych, np. plastydach roślin kodowana jest w genomie jądrowym i syntetyzowana w cytozolu. Białka te importowane są do organelli przy pomocy odpowiednich sygnałów kierujących (peptydów występujących w importowanych białkach) oraz białkowych transporterów zanurzonych w błonach otaczających organelle. Przykładowo, do plastydów roślin białka są importowane za pomocą plastydowych peptydów tranzytowych i translokonów Toc (ang. translocon of the outer envelope of chloroplast) i Tic (ang. translocon of the inner envelope of chloroplast) (BODYŁ i współaut. 2009, SHI i THEG 2013, SJUTS i współaut. 2017). Podobnie jak plastydy roślin, chromatofory *Paulinella* utraciły wiele genów, z których część została przeniesiona do genomu jądrowego gospodarza, m.in. geny kodujące białka zaangażowane w proces fotosyntezy i fotoaklimatyzacji (NOWACK i współaut. 2011). Ze względu na pełnione funkcje, białka te po syntezie w cytozolu komórki gospodarza, powinny być importowane do chromatoforów. Dlatego w błonach chromatoforów *Paulinella* musiał wyewoluować system importu białek kodowanych w genomie jądrowym ameby (MACKIEWICZ i współaut. 2012a, b; NOWACK i GROSSMAN 2012; GAGAT i MACKIEWICZ 2014). Istnienie takiego mechanizmu w chromatoforach *Paulinella* jest ważnym argumentem podważającym paradygmat o rzadkości zdarzeń endosymbiotycznych (MACKIEWICZ i współaut. 2012b, GAGAT i współaut. 2016), ponieważ świadczy

Tabela 1. Porównanie genomów chromatoforów *Paulinella*, sinicy *Cyanobium gracile* PCC 6307 oraz przedstawicieli trzech linii rozwojowych Archaeplastida: glaukofit *Cyanophora paradoxa* (*Glaucophyta*), krasnorost *Cyanidoschyzon merolae* (*Rhodophyta*), zielenica *Chlamydomonas reinhardtii* (*Viridiplantae*, grupa *Chlorophyta*) i roślina *Arabidopsis thaliana* (*Viridiplantae*, grupa *Streptophyta*). Dane uzyskano w oparciu o bazę NCBI.

Gatunek	Grupa systematyczna	Rozmiar genomu [kpz]	Liczba kodowanych białek	Liczba kodowanych rRNA/tRNA	Zawartość par GC [%]
P. chromatophora CCAC 0185	Rhizaria	1021,62	867	6/42	38,0
P. micropora FK01	Rhizaria	977,33	841	6/48	39,9
Cyanobium gracile PCC 6307	Cyanobacteria	3342,36	3004	6/43	68,7
Cyanophora paradoxa	Glaucophyta	135,60	149	6/36	30,5
Cyanidioschyzon merolae	Rhodophyta	149,99	207	3/31	37,6
Chlamydomonas reinhardtii	Viridiplantae	203,83	69	10/29	34,5
Arabidopsis thaliana	Viridiplantae	154,478	85	7/37	36,3

o tym, że system importu może wyewoluować więcej niż jeden raz.

EWOLUCJA GENOMU CHROMATOFORÓW *PAULINELLA*

W porównaniu do genomu blisko spokrewnionej sinicy *Cyanobium gracile* PCC 6307, genomy chromatoforów uległy ponad trzykrotnej redukcji pod względem rozmiaru i liczby kodowanych białek (NOWACK i współaut. 2008). Zestawienie cech genomów chromatoforów *Paulinella*, wolno żyjącej sinicy, oraz plastydów roślin w Tabeli 1 ukazuje podobieństwa i różnice między nimi. Pomimo znacznej redukcji, genomy chromatoforów są wciąż ponad 5–10 razy większe od genomów plastydów roślin sugerując, iż w przypadku *Paulinella* mamy do czynienia z wczesnymi etapami organellogenezy.

W genomach chromatoforów doszło do całkowitego zaniku szlaków biosyntezy niektórych: (i) aminokwasów (Glu, Arg, His, Trp, Met), (ii) kofaktorów (NAD, ryboflawina, tiamina, biotyna, kobalamina, kwas pantotenowy, koenzym A) i (iii) enzymów cyklu Krebsa (NOWACK i współaut. 2008). W części szlaków metabolicznych brakuje jedynie pojedynczych genów, np. genu *hemD* kodującego syntazę uroporfirynogenu III w szlaku syntezy hemu, a w szlaku biosyntezy peptydoglikanu genu *murF* kodującego ligazę D--alanino-D-alaniny. Ciekawym przykładem utraty genu jest *sulA*, który bierze udział w podziale komórki bakteryjnej (NOWACK i współaut. 2008). Jego przeniesienie do genomu jądrowego mogłoby m.in. umożliwić komórce gospodarza przejęcie kontroli nad podziałem chromatoforów. Zanikowi uległo także wiele genów o nieznanych funkcjach, prawdopodobnie zaangażowanych w odpowiedź na zmiany środowiskowe, które stały się zbędne endosymbiontom bytującym wewnątrz komórki ameby (NOWACK i współaut. 2008). Pomimo złożonych relacji metabolicznych pomiędzy gospodarzem a chromatoforem liczba genów kodujących transportery uległa znacznej redukcji w genomach chromatoforów. Sugeruje to silne zaangażowanie i kontrolę nad wymianą metabolitów przez systemy transportu kodowane jądrowo (NOWACK i współaut. 2008, NOWACK 2014).

Zmniejszenie wielkości genomu chromatoforów związane jest także z endosymbiotycznym transferem części genów do genomu jądrowego gospodarza. Dotychczasowe badania wykazały, że przeniesione zostały co najmniej 32 geny. Stanowią one około 0,3-0,8% genów jądrowych gospodarza, podczas gdy u roślin geny uzyskane w ten sposób stanowią 11–14% (NOWACK i współaut. 2011). Proces endosymbiotycznego transferu genów może wciąż jednak trwać, o czym świadczą dwie kopie genów *csoS4A* (u *P. chromatophora* CCAC 0185) i *psaI* (u *P. micropora* FK01), obecne zarówno w genomie jądrowym, jak i w genomach chromatoforów (NOWACK i współaut. 2011, NOWACK 2014). CsoS4A odpowiada za regulację stężenia CO_2 w karboksysomach, natomiast *psaI* koduje podjednostkę stabilizującą trimeryczną strukturę fotosystemu I (PSI). Co ciekawe, jądrowa kopia *csoS4A* charakteryzuje się zwiększonym tempem podstawień niesynonimicznych su-

Tabela 2. Przykładowe geny zaangażowane w proces fotosyntezy, które uległy endosymbiontycznemu transferowi z genomu chromatoforów *Paulinella* do genomu jądrowego gospodarza.

Gen	Kodowane białko	Funkcja	Obecność w genomie			
			P. chromatophora CCAC 0185		*P. micropora* FK01	
			chromatofor	jądro	chromatofor	jądro
psaE	PsaE	regulacja wiązania pomiędzy PSI a ferredoksyną podczas transportu elektronów	nie	tak	nie	tak
psaI	PsaI	stabilizacja trimerycznej struktury PSI	tak	nie	tak*	tak
psaK1, psaK2	PsaK	organizacja układu antenowego PSI	nie	tak	tak	nie
petJ	cytochrom c6	transport elektronów	nie	tak	?	?
psbN	PsbN	?	nie	tak	?	?
csoS4A	CsoS4A	zapobieganie ubytkowi CO_2 z karboksysomów, zwiększanie wydajności RubisCO	tak	tak	?	?

?brak danych, *prawdopodobnie pseudogen z powodu dwóch mutacji nonsensownych

gerując proces zanikania tego genu (nieudany transfer) lub nabycie przez niego nowej funkcji (NOWACK i współaut. 2011, MACKIEWICZ i współaut. 2012b, NOWACK 2014). W przypadku genu *psaI*, kopia chromatoforowa nabyła dwie mutacje nonsensowne stając się pseudogenem (genem niefunkcjonalnym), natomiast kopia jądrowa byłaby przykładem udanego transferu genów i pełniłaby właściwą funkcję (REYES-PRIETO i współaut. 2010, NOWACK 2014). Powyższe geny pokazują, co może dziać się z genem w zależności od konieczności importowania jego produktu do odpowiedniego kompartmentu. Jeżeli białko nie może trafić do endosymbionta/organellum (np. CsoS4A), jego gen nabywa nową funkcję lub ulega przekształceniu w pseudogen. Z kolei, jeśli białko ma być kierowane do jego oryginalnego miejsca funkcjonowania (np. PsaI), jedna z kopii zostaje z czasem utracona (SELOSSE i współaut. 2001).

Endosymbiotycznemu transferowi u *Paulinella* uległo wiele genów zaangażowanych w fotosyntezę i procesy z nią związane. Przykładowo, u *P. micropora* FK01 przeniesione zostały między innymi dwa geny kodujące podjednostki fotosystemu I: *psaE* i wspomniany już *psaI*, natomiast w przypadku *P. chromatophora* CCAC 0185 geny kodujące podjednostki PsaE, PsaK (2 kopie), PsbN i PetJ (REYES-PRIETO i współaut. 2010, NOWACK i współaut. 2011) (Tabela 2). Ze względu na fakt, że brak powyższych białek miałby znaczący wpływ na organizację strukturalną i aktywność fotosystemów, powinny one być importowane do chromatoforów po syntezie w cytozolu (NAKAYAMA i ISHIDA 2009). Warto dodać, że przeniesione do genomu jądrowego zostały także geny *hli* umożliwiające rozwój i wzrost przy silnym oświetleniu (NOWACK i współaut. 2011). Co ciekawe, preferująca zaciemnione siedliska *Paulinella* ma w genomie jądrowym około 30 genów *hli*, podczas gdy sinica *Prochlorococcus marinus* wolno żyjąca przy dużym natężeniu światła, zaledwie 22. Możliwe, że *Paulinella* nie nabyła jeszcze odpowiedniej regulacji tych genów lub są one zaangażowane w inne procesy, takie jak np. obniżanie stresu oksydacyjnego (ZHANG i współaut. 2017).

Pomiędzy *P. chromatophora* i *P. micropora* występują znaczne różnice w zestawie genów, które zostały utracone lub przeniesione do jądra. W genomie chromatoforów *P. chromatophora* CCAC 0185 występuje 39 genów, których nie posiada genom chromatoforu *P. micropora* FK01. Z kolei genom chromatoforu *P. micropora* FK01 zachował 27 genów niekodowanych przez genom chromatoforu *P. chromatophora* CCAC 0185 (REYES-PRIETO i współaut. 2010). Znaczne rozbieżności w sekwencjach DNA obu gatunków *Paulinella* wskazują na to, że ich przodek, po pochłonięciu sinicy, dał początek co najmniej dwóm odrębnym liniom ewolucyjnym, podkreślając tym samym słuszność rozróżnienia szczepów CCAC 0185 i FK01 jako oddzielnych gatunków (YOON i współaut. 2009, LHEE i współaut. 2017).

Chromatofory, poza zdolnością do fotosyntezy, zachowały także możliwość syntezy:

(i) niektórych aminokwasów (Ala, Val, Ile, Leu), (ii) kofaktorów (np. kwasu liponowego i foliowego), (iii) kwasów tłuszczowych, (iv) difosforanu izopentenylu (zaangażowanego w biosyntezę terpenów i terpenoidów), a także (v) zdolność do asymilacyjnej redukcji siarczanów (NOWACK i współaut. 2008). Utrzymane zostały więc korzystne dla gospodarza szlaki syntezy związków, które wcześniej były zaspokajane poprzez odżywianie fagotroficzne (NOWACK 2014, GAGAT i MACKIEWICZ 2017). Potwierdza to, iż ewolucja organellum komórkowego napędzana jest nie tylko brakiem rekombinacji i endosymbiotycznym transferem genów, ale także selekcją naturalną na poziomie całego konsorcjum endosymbiotycznego, np. poprzez wymianę metabolitów pomiędzy endosymbiontem i gospodarzem (VALADEZ-CANO i współaut. 2017).

W związku z tym, że część genów kodujących białka istotne w funkcjonowaniu chromatoforów zostało przetransferowanych do genomu jądrowego ameby, ich produkty muszą być importowane do tych chromatoforów. Zanim spróbujemy odpowiedzieć na pytanie, w jaki sposób się to odbywa, najpierw przyjrzymy się jak wygląda taki import w plastydach roślin.

IMPORT BIAŁEK DO PLASTYDÓW ROŚLIN

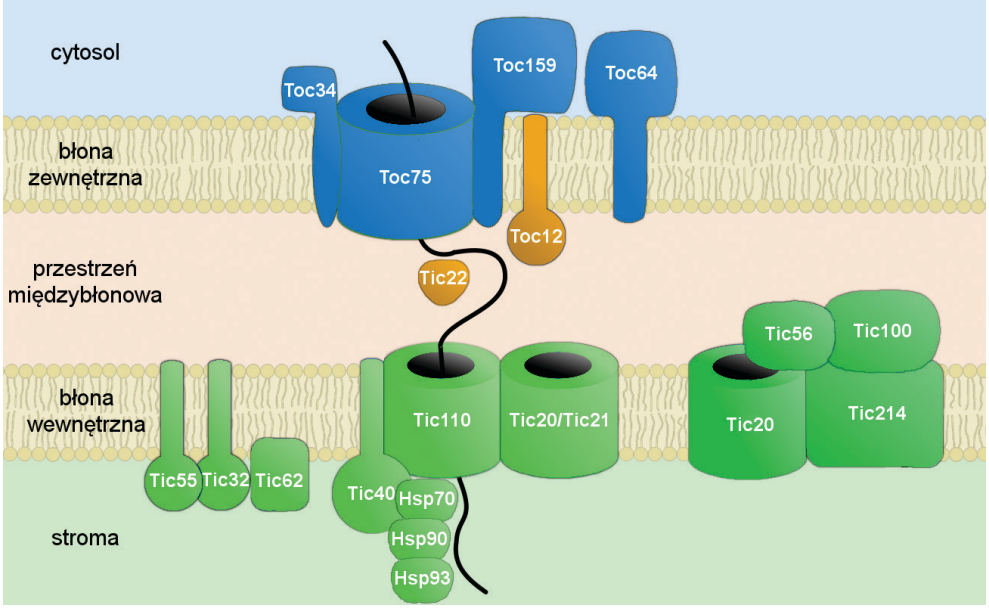
Sinicowe endosymbionty podczas ewolucji w plastydy uległy silnej redukcji tracąc bezpowrotnie lub przenosząc do genomu jądrowego gospodarza tysiące genów. Aby przeniesione geny skutecznie pełniły dalej swoje pierwotne funkcje w plastydach, musiały być syntetyzowane w cytozolu gospodarza, a następnie importowane do tych organelli. Dlatego też wykształcił się system importu białek, składający się zarówno z elementów pochodzenia sinicowego, jak i eukariotycznego, znany dzisiaj pod nazwą translokonu Toc i Tic (Ryc. 3). Każdy z translokonów zawiera centralny kanał oraz związane z nim receptory i białka regulatorowe (SHI i THEG 2013, SJUTS i współaut. 2017).

Prekursory białek importowane do plastydów roślin są syntetyzowane z tzw. peptydami tranzytowymi występującymi najczęściej na N-końcach, czyli początkowych częściach białek (BRUCE 2001, PATRON i WALLER 2007). Plastydowe peptydy tranzytowe charakteryzują się dużą różnorodnością zarówno pod względem długości (od 20 do ponad 100 reszt aminokwasowych), jak i składu aminokwasowego. Generalnie zawierają dużo hydroksylowanych aminokwasów (głównie seryny), natomiast bardzo małą liczbę reszt o charakterze kwasowym, co nadaje im ogólny ładunek dodatni (BRUCE 2001, PATRON i WALLER 2007). Po syntezie na rybosomach w cytozolu komórki (potranslacyjnie), prekursory białek kierowane są do powierzchni plastydów w asyście białek opiekuńczych, gdzie ich peptydy tranzytowe są rozpoznawane przez receptory błony zewnętrznej, tj. Toc34 i Toc159 lub Toc64, a następnie całe białka są transportowane przez kanał Toc75 do przestrzeni międzybłonowej. W niej znajduje się kompleks złożony z białek Toc12 i Tic22, który umożliwia przemieszczenie prekursorów białek do translokonu Tic umieszczonego w błonie wewnętrznej (SHI i THEG 2013, SJUTS i współaut. 2017). Mechanizm transportu przez tę błonę nie jest dokładnie poznany. Obecnie istnieją modele zakładające występowanie dwóch typów kompleksów (KIKUCHI i współaut. 2013, SJUTS i współaut. 2017) (Ryc. 3). Jeden z nich jest złożony z kanałów translokacyjnych Tic110 i Tic20/Tic21, białek regulatorowych Tic55, Tic62 i Tic32 oraz motoru molekularnego obejmującego białka GrpE, Tic40, Hsp70, i Hsp93, który odpowiada za wciąganie importowanych białek do wnętrza plastydu (stromy). Drugi kompleks o masie 1 MDa, zbudowany jest z kanału Tic20 oraz podjednostek Tic56, Tic100 i Tic214.

Znane są również alternatywne drogi transportu białek do plastydów roślin, m.in. mechanizm oparty na pęcherzykach systemu wewnątrzbłonowego komórki. Białka importowane w ten sposób nie posiadają na N-końcu plastydowego peptydu tranzytowego, lecz peptyd sygnałowy zbudowany z kilku do kilkunastu aminokwasów, głównie hydrofobowych i wykazujących tendencję do formowania α-helisy (CHEN i współaut. 2004, VILLAREJO i współaut. 2005, NANJO i współaut. 2006, KITAJIMA i współaut. 2009). Ta droga wyewoluowała stosunkowo późno w historii supergrupy Archaeplastida, jedynie u roślin wyższych i tylko dla nielicznych białek wymagających dołączenia reszt cukrowych (glikozylacji) i/lub kierowanych do więcej niż jednego kompartmentu komórkowego, np. zarówno do plastydów, jak i ściany komórkowej (JARVIS 2008, BODYŁ i współaut. 2009, GAGAT i współaut. 2013).

IMPORT BIAŁEK DO CHROMATOFORÓW *PAULINELLA*

Interesujące jest zbadanie jak wygląda sposób importu białek do chromatoforów *Paulinella*. Czy jest on podobny do tego u plastydów roślin czy zupełnie inny? W genomach chromatoforów pochodzących z *P. chromatophora* CCAC 0185 i *P. micropora* FK01 wykryto geny kodujące homologi białek Toc12, Toc34, Toc159, Tic21, Tic32, Tic62 oraz sekwencję zbliżoną do Toc64, ale

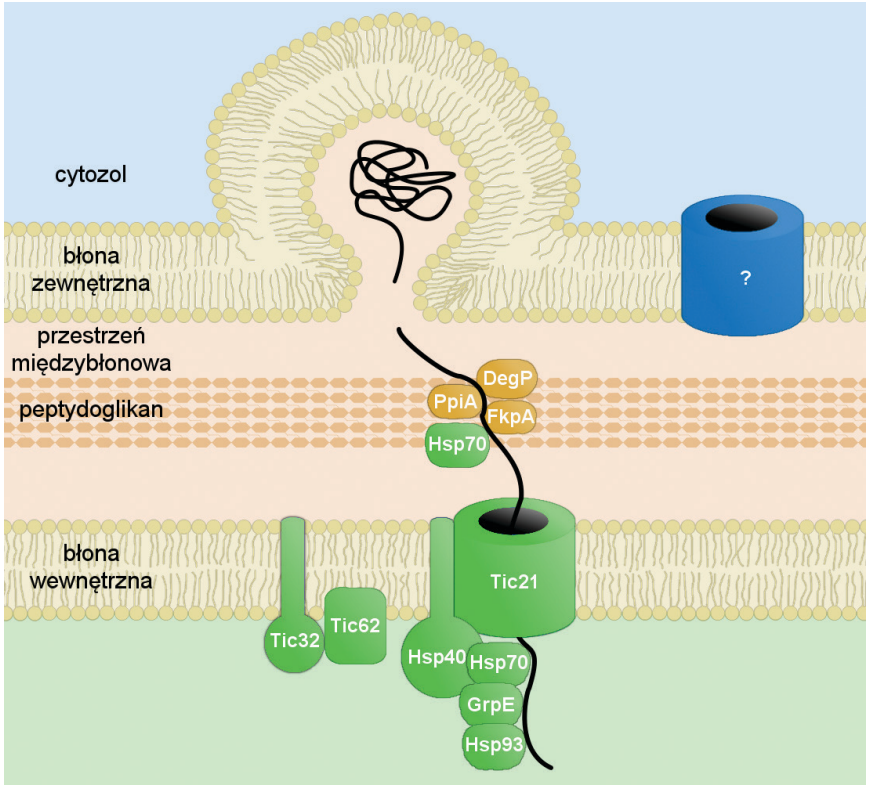


Ryc. 3. Schemat systemu Toc-Tic w plastydach roślin.

Rdzeń translokonu Toc stanowią 3 podjednostki: Toc75 tworząca kanał, przez który transportowane są białka oraz Toc34 i Toc159 będące receptorami dla importowanych białek. Dodatkowym receptorem luźno związanym z rdzeniem kompleksu Toc jest Toc64. Toc12 i Tic22 dostarczają importowane białka do błony wewnętrznej z translokonu Toc. Istnieją dwa modele translokonu Tic. Pierwszy zakłada kompleks zbudowany z białka Tic110 i Tic20/Tic21, które pełnią funkcję kanału oraz mechanizmu motorycznego złożonego z GrpE, Tic40, Hsp70, i Hsp93. Drugi model zakłada, że translokon błony wewnętrznej jest zbudowany z dużego kompleksu (o masie 1 MDa) składającego się z kanału Tic20, Tic56, Tic214 i Tic100 (KIKUCHI i współaut. 2013). Ponadto w kompleksie występują podjednostki Tic55, Tic62 i Tic32 zaangażowane w regulację stanu oksydacyjno-redukcyjnego podczas procesu transportu białek (SJUTS i współaut. 2017).

pozbawioną domeny TPR, która odpowiada za oddziaływanie kompleksu Hsp90 z białkiem prekursorowym (MACKIEWICZ i współaut. 2012b; GAGAT i MACKIEWICZ 2014). Ponieważ Tic21, podobnie jak Tic20, zawiera cztery wewnątrzbłonowe α-helisy zdolne do tworzenia kanału translokacyjnego, w błonie wewnętrznej chromatoforów mógł powstać uproszczony translokon podobny do roślinnego Tic (Ryc. 4). W przeciwieństwie do genomu sinicowego i genomów Archaeplastida, genom chromatoforów nie koduje jednak żadnego homologu Toc75 (Omp85), który mógłby utworzyć kanał dla importu białek w błonie zewnętrznej. W związku z tym, same Toc34 i Toc159 wykryte u *Paulinella* także nie mogą być funkcjonalnymi homologami receptorów związanych z Toc75 (MACKIEWICZ i współaut. 2012b, GAGAT i MACKIEWICZ 2014).

Kolejnym etapem na drodze do zidentyfikowania systemu odpowiedzialnego za import białek do chromatoforów *Paulinella* były analizy sygnałów kierujących białek kodowanych jądrowo, najprawdopodobniej kierowanych do tego kompartmentu. W sekwencji białka PsaE *P. micropora* FK01 odkryto peptyd sygnałowy (MACKIEWICZ i współaut. 2012a, b; GAGAT i MACKIEWICZ 2014), dlatego zaproponowano model importu białek do chromatoforów oparty na systemie wewnątrzbłonowym (Ryc. 4). Zgodnie z tym modelem, białka najpierw trafiają do siateczki śródplazmatycznej i być może również do aparatu Golgiego, a następnie w pęcherzykach systemu wewnątrzbłonowego kierowane są do przestrzeni międzybłonowej chromatoforów. Kolejny etap importu obejmuje przeniesienie przez warstwę peptydoglikanu, do czego przystosowaniem może być niska masa cząsteczkowa importowanych białek (4,4–9,1 kDa) oraz ich obojętny lub zbliżony do obojętnego ładunek. Gdyby białka były naładowane, anionowe grupy peptydoglikanu mogłyby zaburzać ich swobodne przemieszczanie. Na tym etapie możliwy jest również udział białek opiekuńczych, homologicznych do występujących w bakteryjnej przestrzeni peryplazmatycznej, których geny wciąż kodowane są przez genomy chromatoforów. Ostatnim etapem jest transport przez błonę wewnętrzną. Przebiega on najprawdopodobniej przy pomocy systemu, który przez analogię do mechanizmu importu białek u roślin, nazywamy uproszczonym translokonem Tic. Taki translokon mógłby składać się z białek homologicznych do roślinnych Tic: (i) Tic21 będącego ka-



Ryc. 4. Model systemu importu białek kierowanych do chromatoforów *Paulinella*.

Białka docierają do błony zewnętrznej za pomocą pęcherzyków pochodzących z systemu wewnątrzbłonowego (siateczki śródplazmatycznej i aparatu Golgiego). Po fuzji pęcherzyka z błoną, białka są uwalniane do przestrzeni międzybłonowej. Inną drogę transportu przez błonę zewnętrzną mógłby stanowić np. kanał Tom40 lub Tim23 przemieszczony z mitochondrium (MACKIEWICZ i współaut. 2012b). W plastydach roślin wyższych z Tim23 wyewoluował kanał OEP16, przez który importowana jest oksydoreduktaza protochlorofilidu A (PORA) (SAMOL i współaut. 2011), dlatego podobna sytuacja mogłaby zajść u *Paulinella*. Białka, które dostały się do przestrzeni międzybłonowej transportowane są przez warstwę peptydoglikanu przy pomocy białek opiekuńczych, np. DegP, FkpA, PpiA i Hsp70, które są homologami bakteryjnych białek występujących w przestrzeni peryplazmatycznej. Transport białek przez błonę wewnętrzną może zachodzić z udziałem uproszczonego translokonu Tic utworzonego przez kanał transportujący białka Tic21, białka regulujące stan oksydacyjno-redukcyjnego Tic32 i Tic62 oraz komponenty motoru molekularnego GrpE, Hsp40, Hsp70 i Hsp93 (MACKIEWICZ i współaut. 2012a, b; GAGAT i MACKIEWICZ 2014).

nałem transportującym białka, (ii) Tic32 i Tic62 pełniących funkcje regulacyjne przez kontrolę stanu oksydacyjno-redukcyjnego, (iii) motoru molekularnego zbudowanego z białek Hsp40, Hsp70 i Hsp93 i wciągającego importowane białka do wnętrza chromatoforu. Obecność sekwencji podobnych do peptydów sygnałowych również w innych białkach przeniesionych z genomu chromatoforów do genomu jądrowego sugeruje, iż system wewnątrzbłonowy może być głównym szlakiem importu białek do chromatoforów *Paulinella*. Opisany model został częściowo potwierdzony eksperymentalnie (NOWACK i GROSSMAN 2012). Kodowane jądrowo białka związane z kompleksem PSI (PsaE, PsaK1 i PsaK2) są faktycznie syntetyzowane w cytozolu, a następnie importowane z udziałem systemu wewnątrzbłonowego do chromatoforów *Paulinella* (NOWACK i GROSSMAN 2012).

W świetle definicji CAVALIER-SMITHA i LEE (1985), obecność systemu importu białek stanowi decydujący dowód na to, że chromatofory *Paulinella* są prawdziwymi organellami komórkowymi (THEISSEN i MARTIN 2006). Jest to jednocześnie ważny argument podważający paradygmat o rzadkości zdarzeń endosymbiotycznych, ponieważ dowodzi, że endosymbioza sinicy miała miejsce co najmniej dwa razy: w przypadku plastydów roślin i chromatoforów *Paulinella* (MACKIEWICZ i współaut. 2012b, GAGAT i współaut. 2016). Co więcej, znamy wiele innych przykładów relacji sinic z eukariontami, a niektóre z nich osiągnęły już stosunkowo wysoki stopień integracji z komórką gospodarza i w przyszłości mogą stać się organellami komórkowymi, podobnie jak plastydy roślin czy chromatofory *Paulinella*. Jedna z bardziej zaawansowanych relacji endosymbiontycznych występuje pomiędzy okrzemka-

mi *Rhopalodia* a sinicami z rodzaju *Cyanothece*, które odpowiadają za wiązanie azotu. W przypadku *R. gibba* genom endosymbionta wzbogacił się w pary AT, co jest typowe dla endosymbiontów i pasożytów, oraz uległ redukcji o połowę, a wiele jego genów zostało utraconych, skróconych lub stało się pseudogenami (PRECHTL i współaut. 2004, KNEIP i współaut. 2008).

ROLA HORYZONTALNEGO TRANSFERU GENÓW W TRANSFORMACJI CHROMATOFORÓW *PAULINELLA*

Znaczący wpływ na integrację chromatoforów z komórką gospodarza wydaje się mieć również horyzontalny transfer genów (HTG) nabytych od innych organizmów. W genomie jądrowym *P. chromatophora* CCAC 0185 znajduje się co najmniej 229 genów bakteryjnych, wśród których 75% nie wykazuje bliskiego podobieństwa do genów α-sinic, a więc nie może pochodzić z genomu chromatoforów (NOWACK i współaut. 2016). Co ciekawe, niektóre z tych genów zdają się „uzupełniać" braki genów w genomach chromatoforów, powstałe na skutek ich redukcji, np. geny kodujące ligazę D-alanino-D-alaniny (*murF*), polimerazę DNA I (*polA*), ligazę DNA (*ligA*) i O-acetylotransferazę serynową (*cysE*). Znaczna liczba genów nabytych na drodze HTG związana jest prawdopodobnie z fagotroficznym stylem życia przodka fotosyntetycznych *Paulinella* i jego transformacją w organizm fotoautotroficzny. Przemiana fagotrofa w fotoautotrofa wymaga bowiem zdolności do syntezy kompletu tzw. małych związków organicznych, np. aminokwasów, koenzymów i witamin (GAGAT i MACKIEWICZ 2017). Jeśli ich geny zostały wcześniej utracone, muszą być na nowo nabyte od innych organizmów, np. podczas ich połykania (fagotrofii).

PODOBIEŃSTWA I RÓŻNICE POMIĘDZY PLASTYDAMI ROŚLIN I CHROMATOFORAMI *PAULINELLA*

Fakt, iż chromatofory *Paulinella* i plastydy roślin wyewoluowały niezależnie z różnych sinicowych przodków sugeruje potencjalnie odmienność ich ścieżek ewolucyjnych (YOON i współaut. 2009). Ważnym argumentem dowodzącym, że przekształcenie chromatoforów w organelle nie odzwierciedla ewolucji plastydów, są odmienne systemy importu białek do tych organelli. Transport białek do plastydów roślin odbywa się głównie po ich syntezie w cytozolu (potranslacyjnie) przez translokony Toc i Tic, z wykorzystaniem plastydowych peptydów tranzytowych (Ryc. 3), chociaż w świetle hipotezy o wczesnym transporcie pęcherzykowym plastydy także miałyby początkowo wykorzystywać system wewnątrzbłonowy (BHATTACHARYA i współaut. 2007). Hipoteza ta jednak została podważona w oparciu o analizy filogenetyczne, które jednoznacznie pokazały, iż transport pęcherzykowy do plastydów roślin wyewoluował tylko dla nielicznych białek w przypadku roślin wyższych, a więc setki milionów lat od „pochłonięcia" sinicy (GAGAT i współaut. 2013).

W przeciwieństwie do tego, u *Paulinella* część genów przetransferowanych do genomu jądrowego i kodujących białka zaangażowane w proces fotosyntezy ma na swoim N-końcu peptydy sygnałowe. To sugeruje, iż główną drogą importu białek do chromatoforów są pęcherzyki wywodzące się z systemu wewnątrzbłonowego (MACKIEWICZ i współaut. 2012a, b; GAGAT i MACKIEWICZ 2014) (Ryc. 4). Ewolucja takiego transportu pęcherzykowego do chromatoforów wymagała więc bardzo wczesnej zgodności błony zewnętrznej chromatoforu z systemem wewnątrzbłonowym gospodarza, aby pęcherzyki mogły ulegać fuzji z tą błoną. Do zapewnienia kompatybilności tej błony mogło dojść poprzez: (i) chimeryzację, tj. nabycie lipidów i białek pochodzących od gospodarza, np. na skutek ucieczki endosymbionta z fagosomu, lub (ii) zachowanie błony fagosomalnej jako błony zewnętrznej chromatoforu (BODYŁ i współaut. 2009). Pewnego podobieństwa importu białek do chromatoforów i plastydów roślin można się jednak dopatrywać w przypadku pokonywania błony wewnętrznej tych organelli. W obu przypadkach najprawdopodobniej uczestniczą w tym translokony Tic, co może być przykładem ewolucji równoległej.

DLACZEGO *PAULINELLA* NABYŁA ZDOLNOŚĆ DO FOTOSYNTEZY?

Warto zastanowić się co spowodowało, że odżywiający się na drodze fagotroficznej przodek fotosyntetycznych *Paulinella* nabył sinicowego endosymbionta. Możliwe wytłumaczenie przedstawia hipoteza „luggage", zgodnie z którą, dopóki środowisko gospodarza jest bogate w symbionty lub dawców plastydów, najkorzystniejszą strategią będzie odżywianie się nimi bez potrzeby ich stałego utrzymywania (WOUTERS i współaut. 2009). Natomiast, gdy w środowisku ich brakuje, presja selekcyjna będzie faworyzować nabycie i utrzymanie endosymbionta, pomimo że wymaga to wykształcenia kosztownych energetycznie mechanizmów. Przypadek *Paulinella* wpasowuje się w tę hipotezę, ponieważ gatunki heterotroficzne zasiedlają wody morskie, natomiast gatunki fotosyntetyczne (z wyjątkiem *P. longichromatophora*, któ-

ra najprawdopodobniej wtórnie powróciła do morza) występują w zbiornikach słonawych lub słodkowodnych. Sugeruje to, że nabycie endosymbionta mogło wiązać się ze zmianą środowiska i ograniczeniem dostępu do pożywienia. W odróżnieniu od gatunków heterotroficznych innych organizmów, które nabyły zdolność do fotosyntezy stając się miksotrofami, np. bruzdnic lub prazynofitów, fotosyntetyczne *Paulinella* utraciły także zdolność do fagocytozy (Nowack i współaut. 2011). Spowodowane to mogło być warunkami środowiska, ponieważ w zbiornikach eutroficznych (bogatych w związki odżywcze) łatwo można uzyskać proste związki np. na drodze osmozy. Również nabycie genów niezbędnych do syntezy prostych związków na drodze HTG mogło doprowadzić do utraty fagotrofii u tej ameby.

Streszczenie

Pochłonięcie sinicy przez cudzożywne eukarionty i przekształcenie jej w plastyd na drodze endosymbiozy około 1.5 miliarda lat temu było jednym z najważniejszych wydarzeń w ewolucji życia na naszej planecie. Plastydy umożliwiły eukariontom odżywianie z wykorzystaniem światła słonecznego dając początek niezliczonej liczbie nowych gatunków roślin i glonów zaangażowanych w istotne relacje troficzne w skali całego globu. Ze względu na złożoność procesu przekształcenia endosymbionta bakteryjnego w organellum komórkowe, zjawisko endosymbiozy sinicy do niedawna uważane było za niepowtarzalne i wyjątkowe. Poglądy te podważyło odkrycie ameby *Paulinella chromatophora* zawierającej dwa fotosyntetyczne ciałka (chromatofory) właśnie pochodzenia sinicowego. *Paulinella* stanowi zatem drugi przykład endosymbiozy między sinicą a eukariontem, która miała miejsce stosunkowo niedawno, około 90-140 milionów lat temu. Niniejsza praca opisuje przemiany, jakim uległy sinicowe endosymbionty *P. chromatophora*, aby stać się organellami komórkowymi, w szczególności endosymbiontyczny transfer genów i ewolucję systemu importu białek do chromatoforów.

LITERATURA

Ball S. G., Subtil A., Bhattacharya D., Moustafa A., Weber A. P. M., Gehre L., Colleoni C., Arias M.-C., Cenci U., Dauvillée D., 2013. *Metabolic effectors secreted by bacterial pathogens: essential facilitators of plastid endosymbiosis?* Plant Cell 25, 7-21.

Ball S. G., Bhattacharya D., Weber A. P., 2016. *EVOLUTION. Pathogen to powerhouse.* Science 351, 659-60.

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, 1239-46.

Bodył A., Mackiewicz P., Stiller J. W., 2009. *Early steps in plastid evolution: current ideas and controversies.* BioEssays 31, 1219-32.

Bruce B. D., 2001. *The paradox of plastid transit peptides: conservation of function despite divergence in primary structure.* Biochim Biophys Acta 1541, 2-21.

Cavalier-Smith T., Lee J. J., 1985. *Protozoa as hosts for endosymbioses and the conversion of symbionts into organelles.* J Euk Microbiol 32, 376-379.

Chen M. H., Huang L. F., Li H. M., Chen Y. R., Yu S. M., 2004. *Signal peptide-dependent targeting of a rice alpha-amylase and cargo proteins to plastids and extracellular compartments of plant cells.* Plant Physiol 135, 1367-77.

De Clerck O., Bogaert K. A., Leliaert F., 2012. *Chapter two - diversity and evolution of algae: primary endosymbiosis.* [W] *Advances in Botanical Research.* Gwenaël, P. (red.). Academic Press, 55-86.

Delaye L., Valadez-Cano C., Pérez-Zamorano B., 2016. *How Really Ancient Is Paulinella Chromatophora?* PLoS Currents.

Deschamps P., 2014. *Primary endosymbiosis: have cyanobacteria and Chlamydiae ever been roommates?* Acta Societatis Botanicorum Poloniae 83, 291-302.

Gagat P., Mackiewicz P., 2014. *Protein translocons in photosynthetic organelles of Paulinella chromatophora.* Acta Soc Bot Pol 83, 399-407.

Gagat P., Mackiewicz P., 2017. *Cymbomonas tetramitiformis - a peculiar prasinophyte with a taste for bacteria sheds light on plastid evolution.* Symbiosis 71, 1-7.

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.

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

Green B. R., 2011. *Chloroplast genomes of photosynthetic eukaryotes.* Plant J 66, 34-44.

Gross J., Bhattacharya D., 2009. *Mitochondrial and plastid evolution in eukaryotes: an outsiders' perspective.* Nat Rev Genet 10, 495-505.

Jackson C., Clayden S., Reyes-Prieto A., 2015. *The Glaucophyta: the blue-green plants in a nutshell.* Acta Soc Bot Pol 84, 149-165.

Jarvis P., 2008. *Targeting of nucleus-encoded proteins to chloroplasts in plants.* New Phytologist 179, 257-285.

Karkar S., Facchinelli F., Price D. C., Weber A. P., Bhattacharya D., 2015. *Metabolic connectivity as a driver of host and endosymbiont integration.* Proc Natl Acad Sci U S A 112, 10208-15.

Keeling P. J., 2010. *The endosymbiotic origin, diversification and fate of plastids.* Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 365, 729-48.

Kies L., 1974. *Electron microscopical investigations on Paulinella chromatophora Lauterborn, a thecamoeba containing blue-green endosymbionts (Cyanelles).* Protoplasma 80, 69-89.

Kies L., Kremer B. P., 1979. *Function of cyanelles in the tecamoeba Paulinella chromatophora.* Naturewissenschaften 66, 578–579.

Kikuchi S., Bédard J., Hirano M., Hirabayashi Y., Oishi M., Imai M., Takase M., Ide T., Nakai M., 2013. *Uncovering the Protein Translocon at the Chloroplast Inner Envelope Membrane.* Science 339, 571-574.

Kim S., Park M. G., 2016. *Paulinella longichromatophora sp. nov., a new marine photosynthetic testate amoeba containing a chromatophore.* Protist 167, 1-12.

Kitajima A., Asatsuma S., Okada H., Hamada Y., Kaneko K., Nanjo Y., Kawagoe Y., Toyooka

K., MATSUOKA K., TAKEUCHI M., NAKANO A., MITSUI T., 2009. *The rice alpha-amylase glycoprotein is targeted from the Golgi apparatus through the secretory pathway to the plastids*. Plant Cell 21, 2844-58.

KNEIP C., VOSS C., LOCKHART P. J., MAIER U. G., 2008. *The cyanobacterial endosymbiont of the unicellular algae Rhopalodia gibba shows reductive genome evolution*. BMC Evol Biol 8, 30.

LHEE D., YANG E. C., KIM J. I., NAKAYAMA T., ZUCCARELLO G., ANDERSEN R. A., YOON H. S., 2017. *Diversity of the photosynthetic Paulinella species, with the description of Paulinella micropora sp. nov. and the chromatophore genome sequence for strain KR01*. Protist 168, 155-170.

LÖFFELHARDT W., 2014. *The single primary endosymbiotic event*. [W] *Endosymbiosis*. Springer, 39-52.

MACKIEWICZ P., BODYŁ A., GAGAT P., 2012a. *Protein import into the photosynthetic organelles of Paulinella chromatophora and its implications for primary plastid endosymbiosis*. Symbiosis 58, 99-107.

MACKIEWICZ P., BODYŁ A., GAGAT P., 2012b. *Possible import routes of proteins into the cyanobacterial endosymbionts/plastids of Paulinella chromatophora*. Theory Biosci 131, 1-18.

MACKIEWICZ P., GAGAT P., 2014. *Monophyly of Archaeplastida supergroup and relationships among its lineages in the light of phylogenetic and phylogenomic studies. Are we close to a consensus?* Acta Soc Bot Pol 83, 263-280.

MARIN B., NOWACK E. C., MELKONIAN M., 2005. *A plastid in the making: evidence for a second primary endosymbiosis*. Protist 156, 425-32.

MARUYAMA S., KIM E., 2013. *A modern descendant of early green algal phagotrophs*. Curr Biol 23, 1081-4.

MELKONIAN M., MOLLENHAUER D., 2005. *Robert Lauterborn (1869-1952) and his Paulinella chromatophora*. Protist 156, 253-62.

MELKONIAN M., SUREK B., 2009. *Famous algal isolates from the Spessart forest (Germany): the legacy of Dieter Mollenhauer*. Algological Studies 129, 1-23.

MOESTRUP Ø., INOUYE I., HORI T., 2003. *Ultrastructural studies on Cymbomonas tetramitiformis (Prasinophyceae). General structure, scale microstructure, and ontogeny*. Can J Bot 81, 657-671.

NAKAYAMA T., ISHIDA K., 2009. *Another acquisition of a primary photosynthetic organelle is underway in Paulinella chromatophora*. Curr Biol 19, R284-5.

NANJO Y., OKA H., IKARASHI N., KANEKO K., KITAJIMA A., MITSUI T., MUNOZ F. J., RODRIGUEZ-LOPEZ M., BAROJA-FERNANDEZ E., POZUETA-ROMERO J., 2006. *Rice plastidial N-glycosylated nucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase is transported from the ER-golgi to the chloroplast through the secretory pathway*. Plant Cell 18, 2582-92.

NICHOLLS K. H., 2009. *Six new marine species of the genus Paulinella (Rhizopoda: Filosea, or Rhizaria: Cercozoa)*. J Mar Biol Assoc UK 89, 1415-1425.

NOMURA M., NAKAYAMA T., ISHIDA K., 2014. *Detailed process of shell construction in the photosynthetic testate amoeba Paulinella chromatophora (euglyphid, Rhizaria)*. J Euk Microbiol 61, 317-21.

NOWACK E. C., 2014. *Paulinella chromatophora – rethinking the transition from endosymbiont to organelle*. Acta Soc Bot Pol 83, 387-397.

NOWACK E. C., GROSSMAN A. R., 2012. *Trafficking of protein into the recently established photosynthetic organelles of Paulinella chromatophora*. Proc Natl Acad Sci U S A 109, 5340-5.

NOWACK E. C., MELKONIAN M., GLOCKNER G., 2008. *Chromatophore genome sequence of Paulinella sheds light on acquisition of photosynthesis by eukaryotes*. Curr Biol 18, 410-8.

NOWACK E. C., VOGEL H., GROTH M., GROSSMAN A. R., MELKONIAN M., GLOCKNER G., 2011. *Endosymbiotic gene transfer and transcriptional regulation of transferred genes in Paulinella chromatophora*. Mol Biol Evol 28, 407-22.

NOWACK E. C. M., PRICE D. C., BHATTACHARYA D., SINGER A., MELKONIAN M., GROSSMAN A. R., 2016. *Gene transfers from diverse bacteria compensate for reductive genome evolution in the chromatophore of Paulinella chromatophora*. Proc Natl Acad Sci U S A 113, 12214-12219.

PARFREY L. W., LAHR D. J., KNOLL A. H., KATZ L. A., 2011. *Estimating the timing of early eukaryotic diversification with multigene molecular clocks*. Proc Natl Acad Sci U S A 108, 13624-9.

PATRON N. J., WALLER R. F., 2007. *Transit peptide diversity and divergence: a global analysis of plastid targeting signals*. BioEssays 29, 1048-58.

PFANZAGL B., ZENKER A., PITTENAUER E., ALLMAIER G., MARTINEZ-TORRECUADRADA J., SCHMID E. R., DE PEDRO M. A., LÖFFELHARDT W., 1996. *Primary structure of cyanelle peptidoglycan of Cyanophora paradoxa: a prokaryotic cell wall as part of an organelle envelope*. J Bacteriol 178, 332-339.

PONCE-TOLEDO R. I., DESCHAMPS P., LÓPEZ-GARCÍA P., ZIVANOVIC Y., BENZERARA K., MOREIRA D., 2017. *An Early-Branching Freshwater Cyanobacterium at the Origin of Plastids*. Curr Biol 27, 386-391.

PRECHTL J., KNEIP C., LOCKHART P., WENDEROTH K., MAIER U. G., 2004. *Intracellular spheroid bodies of Rhopalodia gibba have nitrogen-fixing apparatus of cyanobacterial origin*. Mol Biol Evol 21, 1477-81.

REYES-PRIETO A., YOON H. S., MOUSTAFA A., YANG E. C., ANDERSEN R. A., BOO S. M., NAKAYAMA T., ISHIDA K., BHATTACHARYA D., 2010. *Differential gene retention in plastids of common recent origin*. Mol Biol Evol 27, 1530-7.

RICHLY E., LEISTER D., 2004. *An improved prediction of chloroplast proteins reveals diversities and commonalities in the chloroplast proteomes of Arabidopsis and rice*. Gene 329, 11-6.

SAMOL I., ROSSIG C., BUHR F., SPRINGER A., POLLMANN S., LAHROUSSI A., VON WETTSTEIN D., REINBOTHE C., REINBOTHE S., 2011. *The outer chloroplast envelope protein OEP16-1 for plastid import of NADPH:protochlorophyllide oxidoreductase A in Arabidopsis thaliana*. Plant Cell Physiol 52, 96-111.

SELOSSE M., ALBERT B., GODELLE B., 2001. *Reducing the genome size of organelles favours gene transfer to the nucleus*. Trends Ecol Evol 16, 135-141.

SHI L. X., THEG S. M., 2013. *The chloroplast protein import system: from algae to trees*. Biochim Biophys Acta 1833, 314-31.

SJUTS I., SOLL J., BÖLTER B., 2017. *Import of soluble proteins into chloroplasts and potential regulatory mechanisms*. Front Plant Sci 8.

THEISSEN U., MARTIN W., 2006. *The difference between organelles and endosymbionts*. Curr Biol 16, R1016-R7.

VALADEZ-CANO C., OLIVARES-HERNÁNDEZ R., RESENDIS-ANTONIO O., DELUNA A., DELAYE L., 2017. *Natural selection drove metabolic specialization of the chromatophore in Paulinella chromatophora*. BMC Evol Biol 17, 99.

VAN WIJK K. J., 2004. *Plastid proteomics*. Plant Physiol Biochem 42, 963-77.

VILLAREJO A., BUREN S., LARSSON S., DEJARDIN A., MONNE M., RUDHE C., KARLSSON J., JANSSON S., LEROUGE P., ROLLAND N., VON HEIJNE G., GREBE M., BAKO L., SAMUELSSON G., 2005. *Evidence for a protein transported through the secretory pathway en route to the higher plant chloroplast*. Nat Cell Biol 7, 1224-31.

WOUTERS J., RAVEN J. A., MINNHAGEN S., JANSON S., 2009. *The luggage hypothesis: comparisons of two phototrophic hosts with nitrogen-fixing cyanobacteria and implications for analogous life strategies for kleptoplastids/secondary symbiosis in dinoflagellates*. Symbiosis 49, 61-70.

YOON H. S., HACKETT J. D., CINIGLIA C., PINTO G., BHATTACHARYA D., 2004. *A molecular timeline for the origin of photosynthetic eukaryotes*. Mol Biol Evol 21, 809-18.

YOON H. S., NAKAYAMA T., REYES-PRIETO A., ANDERSEN R. A., BOO S. M., ISHIDA K., BHATTACHARYA D., 2009. *A single origin of the photosynthetic organelle in different Paulinella lineages*. BMC Evol Biol 9, 98.

ZHANG R., NOWACK E. C., PRICE D. C., BHATTACHARYA D., GROSSMAN A. R., 2017. *Impact of light intensity and quality on chromatophore and nuclear gene expression in Paulinella chromatophora, an amoeba with nascent photosynthetic organelles*. Plant J.

ZIMORSKI V., KU C., MARTIN W. F., GOULD S. B., 2014. *Endosymbiotic theory for organelle origins*. Curr Opin Microbiol 22, 38-48.

KOSMOS Vol. 67, 3, 661–673, 2018

KATARZYNA SIDORCZUK, PAWEŁ MACKIEWICZ, PRZEMYSŁAW GAGAT

Department of Genomics, Faculty of Biotechnology, University of Wrocław, 14A Joliot-Curie Str., 50-383 Wrocław, E-mail: przemyslaw.gagat@uwr.edu.pl

PAULINELLA CHROMATOPHORA – AN UNUSUAL PHOTOSYNTHETIC ADVENTURE OF AN AMOEBA AND A CYANOBACTERIUM

Summary

The endosymbiotic transformation of a cyanobacterium into a plastid by heterotrophic eukaryotes, about 1.5 billion years ago, was one of the most important events in the evolution of life on our planet. Plastids made photoautotrophic lifestyle possible for eukaryotes and thereby created countless new species of plants and algae, essential from the point of view of global trophic relationships. Since the transformation of bacterial endosymbionts into organelles seems extremely complex, cyanobacterial endosymbiosis has been considered to be an unique event. This view was, however, challenged by the discovery of an amoeba *Paulinella chromatophora*, which harbours two photosynthetic cyanobacteria-derived bodies (chromatophores). *Paulinella* constitutes the second case of cyanobacterial endosymbiosis that took place about 90–140 million years ago. This article describes the pathway that led cyanobacterial endosymbionts of *P. chromatophora* to become cellular organelles, including endosymbiotic gene transfer and evolution of import machinery for nuclear-encoded, chromatophore-targeted proteins.

Key words: chromatophore, cyanobacteria, endosymbiosis, evolution, *Paulinella*, plastid, transport