

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: MOBIBO



Anna Vanclová

## **Transport proteinů do sekundárních plastidů**

Transport of proteins into secondary plastids

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Vladimír Hampl, Ph.D.

Praha 2012

## **Poděkování**

Na tomto místě bych ráda poděkovala především svému školiteli Mgr. Vladimíru Hamplovi Ph.D. za motivaci a pomoc při psaní této práce a také všem kolegům z laboratoře za přátelskou atmosféru.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

v Praze dne 10. 5. 2012

.....

Anna Vanclová

## Obsah

<b>Abstrakt</b> .....	4
<b>1. Úvod</b> .....	5
<b>2. Evoluční původ plastidů</b> .....	6
<b>3. Transport proteinů do primárních plastidů</b> .....	7
<b>4. Transport proteinů do sekundárních plastidů</b> .....	10
<b>4.1. Euglenophyta</b>	
4.1.1 Euglenophyta a jejich plastidy.....	10
4.1.2 Signální domény.....	11
4.1.3 Průběh transportu .....	12
<b>4.2. Chlorarachniophyta</b>	
4.2.1 Chlorarachniophyta a jejich plastidy.....	13
4.2.2 Signální domény.....	13
4.2.3 Průběh transportu .....	14
<b>4.3. Cryptophyta</b>	
4.3.1 Cryptophyta a jejich plastidy.....	15
4.3.2 Signální domény.....	15
4.3.3 Průběh transportu .....	16
<b>4.4. Haptophyta</b>	
4.4.1 Haptophyta a jejich plastidy .....	18
4.4.2 Signální domény.....	18
4.4.3 Průběh transportu .....	19
<b>4.5. Heterokontophyta</b>	
4.5.1 Heterokontophyta a jejich plastidy.....	20
4.5.2 Signální domény.....	20
4.5.3 Průběh transportu .....	21
<b>4.6. Dinoflagellata</b>	
4.6.1 Dinoflagellata a jejich plastidy.....	23
4.6.2 Signální domény.....	24
4.6.3 Průběh transportu .....	25
<b>4.7. Apicomplexa</b>	
4.7.1 Apicomplexa a jejich plastid .....	27
4.7.2 Signální domény.....	28
4.7.3 Průběh transportu .....	29
<b>5. Závěr</b> .....	32
<b>Seznam použité literatury</b> .....	35

## **Abstrakt**

Sekundární plastidy se vyskytují u mnoha nepříbuzných skupin organismů v rámci tří různých eukaryotických říší – Excavata, Rhizaria a Chromista. Naproti tomu plastidy primární jsou určujícím unikátním znakem říše Archaeplastida. Sekundární plastidy vznikly hned několika nezávislými endosymbiotickými událostmi, při nichž došlo k pohlcení eukaryotní buňky obsahující primární plastid a její redukcí a integraci přesunutím množství genů do hostitelského jádra. Zásadním rozdílem oproti primárním plastidům je zvýšený počet membrán, přes které je nutno importovat mimo jiné proteiny kódované v jádře. Mechanismy transportu proteinů do sekundárních plastidů jsou tedy složitější, účastní se jich větší množství molekul a signálních sekvencí. S různorodostí organismů vybavených sekundárními plastidy pozoruhodně kontrastuje fakt, že jimi využívané transportní dráhy a jejich komponenty jsou si často dosti podobné jak mechanismem funkce, tak původem. Tyto podobnosti jsou pravděpodobně dány obecnými buněčnými principy a nikoli společnou fylogenezí.

**Klíčová slova:** sekundární plastid, targeting proteinů, signální sekvence, apikoplast, Chromista, Euglenophyta, Chlorarachniophyta

## **Abstract**

Secondary plastids can be found in many unrelated groups of organisms among three supergroups – Excavata, Rhizaria and Chromista. Primary plastids in contrast are unique and defining feature of the Archaeplastida supergroup. Secondary plastids have arisen through several independent endosymbiotic events, in which engulfment of an eukaryotic cell containing primary plastid occurred and its reduction and integration by transferring bulk of their genome into host nucleus occurred. Crucial difference between primary and secondary plastids is number of surrounding membranes which need to be crossed by nucleus-encoded proteins which is higher in secondary plastids. Mechanisms of protein transport into secondary plastids are therefore more complicated and more molecules and signals partake in these mechanisms. Diversity of secondary plastid-bearing organisms notably contrasts with the fact that the transport pathways and molecules they use often share mechanism of function and origin. These similarities probably reflect general principles of cell biology and not phylogeny.

**Keywords:** secondary plastid, protein targeting, signal sequence, apicoplast, Chromista, Euglenophyta, Chlorarachniophyta

## 1. Úvod

V této práci se budu snažit shrnout a utřídit dosavadní poznatky ohledně mechanismů transportu proteinů do sekundárních plastidů a molekul a signálních sekvencí, které jej umožňují.

Plastidy jsou semiautonomní organely, které byly původně nezávislými prokaryotními či eukaryotními endosymbionty. V evoluci dochází k jejich „zotročení“ hostitelskou buňkou přesunem množství jejich genů do vlastního jádra. Proteiny kódované těmito geny jsou nezbytné pro fungování plastidů, ale jejich syntéza probíhá v cytoplazmě, proto je nutné je do plastidu následně dopravit. Nutnost importu jaderně kódovaných proteinů je vůbec základním kritériem pro odlišení endosymbionta od pravé, zcela integrované organely.

Původ sekundárních plastidů není monofyletický, vyskytují se u mnoha nepříbuzných skupin organismů a vznikly několika nezávislými endosymbiotickými událostmi. Od toho se odvíjí jejich struktura a meziskupinové rozdíly v ní. Zásadní změnou oproti primárním plastidům, se kterou se musel systém transportující proteiny do plastidu vyrovnat, je zvýšení počtu obalových membrán o jednu až dvě a funkční – a mnohdy i fyzická – asociace vnější membrány s endoplazmatickým retikulem. Ve speciálních případech přibývá další, jinak obvykle redukovaný, buněčný kompartment – periplastidální prostor, pozůstatek cytoplazmy eukaryotního endosymbionta včetně redukovaného jádra.

Vzhledem k vzájemné nepříbuznosti sekundárních plastidů u různých skupin organismů lze u mechanismů transportu proteinů očekávat vysokou míru diverzifikace. Ve skutečnosti to však příliš neplatí. Naopak, u některých skupin s plastidy zcela odlišného evolučního původu lze nalézt pozoruhodné shody a podobnosti v mechanismech i molekulách, tedy příklady evoluční konvergence na molekulární úrovni.

Na nesmírně heterogenní pseudoskupině „organismů se sekundárními plastidy“ je možná jednou z nejvíce fascinujících věcí právě to, jak jsou si tyto jejich organely, nebo alespoň některé s nimi související mechanismy, na molekulární úrovni podobné.

## 2. Evoluční původ plastidů

Plastidy jsou semiautonomní orgány endosymbiotického původu a vyskytují se u řady nepříbuzných skupin organismů. Původ plastidů je monofyletický, odvíjí se od jedné endosymbiotické události, při níž došlo k pohlcení cyanobakterie eukaryotní buňkou. Jedinou dosud známou výjimkou je chromatofor protista *Paulinella chromatophora* z kmene Cercozoa, který byl nabyt endosymbiózou zcela nezávislou (Yoon et al. 2009). Kromě těchto dvou primárních endosymbióz v evoluci proběhlo množství endosymbióz vícenásobných, tedy pohlcení eukaryotní buňky, která již plastid obsahovala. Názory na počet těchto událostí a jejich pozice ve fylogenezi se různí. Podle chromalveolární hypotézy (Cavalier-Smith 1999; Keeling 2009) proběhla sekundární endosymbióza pouze třikrát, avšak jiné hypotézy považované v současnosti za pravděpodobnější vysvětlují tytéž plastidy vyšším počtem endosymbióz sekundárních i vyšších řádů (Dorrell and Smith 2011; Baurain et al. 2010).

Několikanásobné endosymbiotické události generují kolem plastidu vyšší počet obalových membrán, jejichž původ je různý a ne vždy známý, vnitřní dvě ale vždy odpovídají membránám prokaryotního předka plastidu. U některých sekundárních plastidů se navíc vyskytují pozůstatky eukaryotního endosymbionta v periplastidálním kompartmentu (PPC) mezi dvěma prostředními membránami: remnantní cytoplazma či zbytek buněčného jádra zvaný nukleomorf.

Způsob číslování membrán sekundárních plastidů není jednotně stanoven, v této práci je budu číslovat vzestupně zevnitř plastidu: membrána homologická s vnitřní membránou primárního plastidu tedy bude označována jako první, membrána odvozená od hostitelského endomembránového systému jako čtvrtá (či třetí v případě plastidů obalených pouze třemi membránami).

Sekundární plastidy lze rozdělit na dvě barevné linie podle toho, zda je jejich eukaryotním předchůdcem zelená nebo červená řasa. Toto rozdělení však nereflektuje příbuznost plastidů v každé z linií, nejedná se o monofyletické skupiny. Zelené sekundární plastidy se vyskytují u skupin Euglenophyta, Chlorarachniophyta a u dinoflageláta *Lepidodinium*. Červené pak u Cryptophyta, Heterokontophyta, Haptophyta a většiny Dinoflagellata. Zvláštním případem plastidu je apikoplast skupiny Apicomplexa (Maréchal and Cesbron-Delauw 2001), který evolučně náleží do červené linie, ale schopnost fotosyntézy a fotosyntetické pigmenty druhotně ztratil. Atypická je rovněž skupina Dinoflagellata, u níž se jako jediné vyskytuje mnoho typů plastidů různých původů.

### 3. Transport proteinů do primárních plastidů

Genom plastidů je redukováný a množství genů esenciálních pro jeho funkci bylo přesunuto do jádra hostitelské buňky. Jejich proteinové produkty je proto nutné importovat z cytoplazmy do plastidu. Stromální proteiny či proteiny vnitřní membrány plastidu procházejí dvěma obalovými membránami, proteiny thylakoidů pak navíc ještě membránou thylakoidů (Jarvis and Robinson 2004). Obdobná situace nastává u mitochondrií, jež jsou rovněž semiautonomními organelami endosymbiotického původu a vybavenými dvěma membránami. Transportní mechanismy mitochondrie jsou v mnohém podobné těm plastidovým, v některých aspektech se ale liší, ať již z důvodu odlišného evolučního původu či čistě praktické nutnosti odlišit transportní dráhy do těchto dvou organel, které spolu v buňce koexistují.

V této kapitole stručně popíšeme mechanismus importu proteinů do primárních plastidů ve srovnání s jeho obdobou u mitochondrií.

Transport probíhá posttranslačně. Protein je transportován ve formě nefunkčního preproteinu, není sbalený a je vybavený signální sekvencí, tzv. tranzitním peptidem. Tranzitní peptid plastidových proteinů je kladně nabitý N-koncový úsek bohatý na hydroxylované aminokyseliny, jehož konkrétní primární struktura může vypadat různě. Tranzitní peptid mitochondriálních proteinů má odlišné vlastnosti a hlavní aminokyselinou v něm zastoupenou je arginin. Po syntéze proteinu na cytosolickém ribozómu je tento signál rozeznáván kofaktory, v tomto případě především chaperony Hsp70, které napomáhají jeho navedení k plastidu a udržují jej v nesbaleném stavu. Na povrchu plastidu je protein rozeznáván receptory a za spotřeby energie translokován kanály v membráně. V cílovém místě dochází k odstrižení tranzitního peptidu a sbalení proteinu do nativní konformace. Proteiny směřující do membrány či lumen thylakoidů obsahují ještě jednu signální sekvenci, která je odhalena až po odstrižení tranzitního peptidu ve stromatu a která jej poté naviguje ze stromatu do thylakoidu (van Dooren et al. 2001).

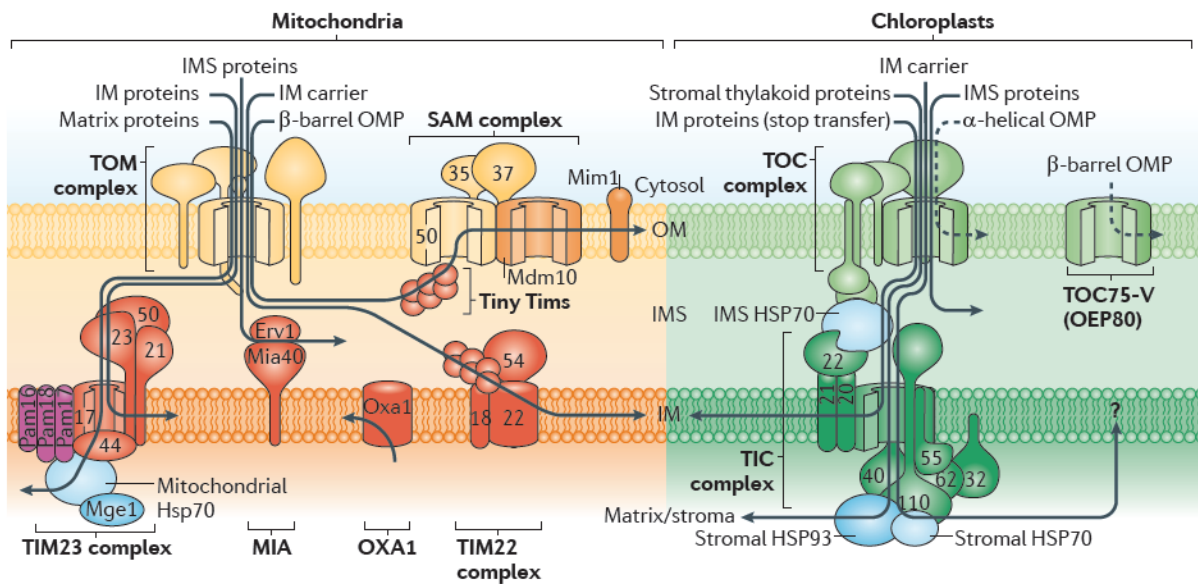
Za transport přes jednotlivé membrány zodpovídají translokační systémy vnější a vnitřní membrány, u chloroplastů jsou to Toc (Translocator of Outer Chloroplast Membrane) a Tic (Translocator of Inner Chloroplast Membrane), u mitochondrií jejich obdoby Tom a Tim (obr. 1). Jedná se o proteinové komplexy složené z množství různých podjednotek, z nichž některé tvoří receptory na cytosolické straně membrány, jiné udržují stabilitu komplexu a hrají roli v jeho skládání a jiné tvoří samotný membránový kanál.

Součástími komplexu Toc jsou podjednotky Toc12, 34, 64, 75 a 159. Toc34 hraje roli ve skládání komplexu a jeho stabilizaci, zároveň je hlavním receptorem, který rozeznává preproteiny směřující do plastidu. U mitochondrie jeho funkci zastávají Tom22 (skládání komplexu) a 20 (receptor). Receptorem je rovněž Toc64, který se nachází na periférii komplexu a některé proteiny postupují nejprve přes něj a na Toc34 jsou předány až následně. Jeho mitochondriální obdobou je Tom70. Tato podjednotka není pro správné fungování translokátoru esenciální. Toc159 koordinuje skládání komplexu a zodpovídá za předávání proteinů na pór translokátoru. Pro transport je nezbytný a v mitochondrii jeho funkci zastává Tom22. Samotný kanál tvoří Toc75, protein beta-barelové struktury, jehož mitochondriálním analogem je Tom40. Kanály Toc75 tvoří čtyřčlenná uskupení, zatímco kanály Tom40 pouze dvou- či tříčlenná. Hnací silou transportu přes vnější membránu chloroplastu je GTPázová aktivita podjednotek Toc159 a 34, u mitochondrie nedochází ke spotřebě energetických ekvivalentů a transport probíhá mechanismem affinity chain, na základě zvyšujících se afinit podjednotek k substrátu. Toc12 se nachází v mezimembránovém prostoru, kde interaguje s komponenty Tic komplexu (Schleiff and Becker 2011; Stengel 2009).

Centrální součástí Tic komplexu zajišťujícího import přes vnitřní plastidovou membránu je podjednotka Tic110, která tvoří kanál a na stromální straně membrány organizuje třídění a úpravy proteinů po importu. Na tvorbě kanálu se podílí i Tic20. Vztah mezi těmito podjednotkami není jasný, ale je možné, že podobně jako mitochondriální Tim17, 22 a 23 tvoří různé kanály, které mohou být specifické pro odlišné typy proteinů. Podjednotka Tic40 interaguje se stromálními chaperony, které napomáhají sbalení přichozího proteinu. Tic32, 55 a 62 se podílí na regulaci transportu, který funguje na redoxním principu (Benz et al. 2008). Tic22 směřuje do mezimembránového prostoru a interaguje s komplexem Toc (Stengel et al. 2009). Proces transportu přes Tic komplex vyžaduje energii ve formě ATP, totéž platí o Tim v mitochondrii. Zatímco Tim energii využívá ke generování gradientu nutného pro import proteinů, za většinu spotřeby ATP Tic pravděpodobně zodpovídají s ním asociované chaperony s ATPázovou aktivitou, především Hsp93 a také Hsp70 (Benz et al. 2008).

Systémy Toc a Tic na sebe přímo navazují, importovaný protein po průchodu vnější membránou plynule pokračuje translokátorem vnitřní membrány, import může pokračovat skrz kanál Tic, i když část preproteinu ještě prochází kanálem Toc komplexu. Komplexy jsou asociovány interakcemi některých svých komponent, mezimembránový prostor je v místech jejich výskytu zúžený (van Dooren et al. 2001).





**Obr. 1** Srovnání translokačních systémů mitochondrie a chloroplastu. Transport přes vnější membránu zajišťují komplexy Tom a Toc, transport přes vnitřní membránu a třídění proteinů do různých částí plastidu komplexy Tim a Tic, někdy ve spolupráci s dalšími funkčními jednotkami. Tim23 kooperuje s komplexem PAM (presequence-associated motor) a chaperony Hsp70, čímž získává hnací sílu pro transport. Ve formě nenavázané na PAM pak navádí proteiny do vnitřní membrány. Malé molekuly Tim (Tiny Tims) navádějí proteiny ke komplexu SAM, který zprostředkovává jejich inzerci do vnější membrány. Transport přes komplex Tic je poháněn za pomoci Hsp93 a 70 a mechanismus, kterým přichází proteiny třídí a vkládá do vnitřní membrány, není dosud dobře prozkoumán. Je jisté, že probíhá dvěma drahami: jedna se odvíjí přímo v Tic, druhá do membrány zpětně vede proteiny již importované do stromatu (převzato z Schleiff and Becker 2011).

## 4. Transport proteinů do sekundárních plastidů

Sekundární plastidy se od primárních liší počtem obalových membrán, namísto dvou mají tři nebo čtyři. Transportované proteiny tedy procházejí jednou až dvěma membránami navíc, což činí transport do sekundárních plastidů komplikovanějším. Zatímco transport přes dvě vnitřní membrány patrně probíhá podobně jako u plastidu primárního, přes třetí, případně čtvrtou membránu procházejí proteiny odlišnými mechanismy a za přispění odlišných molekul. Vzhledem k tomu, že sekundární plastidy nejsou monofyletického původu a vyskytují se u různých nepříbuzných skupin organismů, jsou tyto mechanismy a molekuly z evolučního hlediska pozoruhodné.

V následujících kapitolách budou postupně probrány detaily transportu do sekundárních plastidů u jednotlivých skupin organismů, které jimi disponují. V každé z kapitol bude stručně charakterizována skupina organismů, její sekundární plastidy a jejich původ. Podrobněji popsány budou signální sekvence, které jsou pro transport proteinů do těchto plastidů esenciální, a následně i průběh transportu a dosud identifikované molekuly, které se ho účastní.

### 4.1. Euglenophyta

#### 4.1.1. Euglenophyta a jejich plastidy

Euglenophyta je označení pro vnitřní skupinu organismů kmene Euglenozoa v říši Excavata. Její členové jsou fotosyntetičtí a své plastidy získali pohlcením zelené řasy jejímž nejbližším známým příbuzným je rod *Pyramimonas* (Turmel et al. 2008). Přejít mezi fagotrofií, evolučně původním způsobem výživy euglenidů, a fototrofií demonstruje nedávno objevený mořský protist *Rapaza viridis*. Tento organismus je sesterskou linií euglenophyt a jako jediný z euglenidů získává živiny mixotrofií, při níž fagocytuje některé řasy a zároveň provádí fotosyntézu (Yamaguchi et al. 2012).

Plastidy euglenophyt jsou morfologicky velmi podobné plastidům řas, z nichž pocházejí, zásadním rozdílem však je, že jsou obklopeny třemi membránami namísto dvou. Původ přídatné vnější membrány není dosud s jistotou znám. Může být analogická s cytoplazmatickou membránou endosymbionta nebo s membránou hostitelského fagozomu.

### 4.1.2. Signální domény

Preproteiny cílené do plastidů euglenophyt lze rozdělit na tři skupiny lišící se konečnou lokalizací z nich maturovaných proteinů a tak i adresovou sekvencí.

Signál preproteinů I. třídy je tripartitní (obr. 2). Na svém N-konci mají dvě hydrofobní oblasti, jejichž sekundárními strukturami jsou podle predikce transmembránové helixy. První z nich odpovídá klasickému signálnímu peptidu a na základě jejího rozpoznání je protein kotranslačně transportován do endoplazmatického retikula. Tam dochází k jejímu odštěpení signální peptidázou ve štěpném místě nacházejícím se hned za ní (Nassoury and Morse 2004). Druhá hydrofobní oblast se nachází 52-68 aminokyselin za koncem první a dosahuje délky 45-98 aminokyselin (Durnford and Gray 2006). Tato část plní funkci stop-transfer signálu díky němuž protein neprojde membránou do lumen retikula, ale zůstane integrován v jeho membráně (Agrawal and Striepen 2010). Třetí částí signálu je tranzitní peptid nacházející se mezi zmíněnými hydrofobními oblastmi. Jeho primární struktura nemá konkrétní podobu, je pro něj ale typický zvýšený obsah hydroxylovaných aminokyselin (přes 15%), obzvláště threoninu, a také vysoký obsah alaninu (Patron and Waller 2007). Tento signál zodpovídá za transport přes vnitřní dvě membrány plastidu do definitivního místa určení těchto proteinů, stromatu plastidu.

Třída preproteinů označovaná Ib se dá považovat za podskupinu třídy I. Signální sekvence těchto proteinů je složená ze stejných tří částí jako u třídy I, 25-30 aminokyselin za nimi se však nachází ještě jedna hydrofobní oblast, která připomíná signální peptid a zprostředkovává navedení do lumen thylakoidu.

Signál preproteinů třídy II je pouze bipartitní, narozdíl od signálu třídy I neobsahuje druhou hydrofobní sekvenci a skládá se tedy jen ze signálního a tranzitního peptidu, pro jehož složení je rovněž typický zvýšený obsah hydroxylovaných reziduí. Tyto preproteiny se do plastidu dostávají nejspíše ve vezikulech společně s preproteiny I. třídy (Durnford and Gray 2006).

Velmi podobné rozlišení preproteinů na tři třídy, resp. dvě třídy a jednu podtřídu, bylo zaznamenáno u dinoflagelátů vybavených červeným sekundárním plastidem (peridin obsahující Dinoflagellata), který rovněž obalují tři membrány (obr. 4, str. 26).



**Obr. 2** Uspořádání signálních sekvencí preproteinů euglenophyt. SS (signální peptid) a TP (tranzitní peptid) jsou přítomny u všech tříd preproteinů. ST (stop-transfer sekvence) je druhým hydrofobním regionem preproteinů třídy I a Ib, který chybí u třídy II. LTD (lumen-targeting doména) je přítomna pouze u preproteinů třídy Ib (převzato a upraveno z Durnford and Gray 2006).

#### 4.1.3. Průběh transportu (obr. 5, str. 32)

Průběh transportu proteinů do plastidů euglenophyt by se dal rozdělit na dvě fáze. V první je preprotein importován přes vnější membránu plastidu prostřednictvím endomembránového systému, v druhé prochází vnitřními dvěma membránami, patrně podobným mechanismem, jako se to děje u primárního plastidu (Sulli et al. 1999).

Syntéza proteinu začíná na ribozómu v cytoplazmě. Signální peptid na N-konci preproteinu je nasyntetizován jako první a jakmile vystoupí z ribozómu, rozeznává jej molekula, která se na něj váže a navádí jej k translokátoru na membráně endoplazmatického retikula, jímž je nejspíše Sec61 translokon (Rapoport 2008), skrz který jeho translace pokračuje. V lumen endoplazmatického retikula dochází k odštěpení signálního peptidu v restriktivním místě signální peptidázou. Od endoplazmatického retikula se odděluje vezikul s nákladem proteinů a pokračuje přes Golgiho aparát k plastidu, s jehož vnější membránou splyne. Preproteiny tříd I a Ib, které obsahují hydrofobní stop-transfer signál, přitom zůstávají integrovány v membráně, zatímco preproteiny třídy II se dostávají až do lumen a patrně jsou „svezeny“ (hitchhike) společně s preproteiny I. třídy (Durnford and Gray 2006). Mechanismus rozeznání a splynutí s cílovou membránou není dosud prozkoumán. Na ději se patrně nepodílejí receptory SNARE, jež jsou citlivé na N-ethylmaleimid, neboť při pokusech nebyl touto látkou inhibován (Sláviková et al. 2005). Preproteiny se dostávají do vnější plastidové membrány, nebo do prostoru mezi membránou druhou a třetí, odkud si je na základě rozeznání jejich tranzitního peptidu přebírá translokační systém, který je přenáší do stromatu plastidu. Mechanismus tohoto děje zatím není znám, ale mohl by být podobný mechanismu transportu přes membrány primárních plastidů (Nassoury and Morse 2004).

## **4.2. Chlorarachniophyta**

### **4.2.1. Chlorarachniophyta a jejich plastidy**

Chlorarachniophyta je skupina protistních organismů kmene Cercozoa v říši Rhizaria, kterým je společná amébovitá morfologie a schopnost fotosyntézy, která je buď jediným zdrojem energie, nebo je kombinována s fagotrofií. Plastidy chlorarachniophyt byly získány sekundární endosymbiózou se zatím neurčeným druhem zelené řasy (Rogers et al. 2007). Na rozdíl od zelených plastidů euglenophyt jsou obaleny čtyřmi membránami. Vnitřní dvě jsou prokaryotního původu, třetí je homologická s cytoplazmatickou membránou endosymbionta a čtvrtá pochází z endomembránového systému hostitelské buňky. Na rozdíl od jiných čtyřmembránových sekundárních plastidů a stejně jako u apikoplastu skupiny Apicomplexa není tato vnější membrána kontinuální s endoplazmatickým retikulem a neobsahuje ribozómy (Bolte et al. 2009). Další zvláštností plastidů těchto organismů je přítomnost nukleomorfu, silně zredukovaného jádra endosymbionta, které se nachází v periplastidálním kompartmentu (PPC) mezi vnitřním a vnějším párem membrán a kóduje jen malé množství genů, převážně pro svou vlastní replikaci a údržbu (Moore and Archibald 2009).

### **4.2.2. Signální domény**

Adresová sekvence preproteinů cílených do plastidu chlorarachniophyt je vždy bipartitní. Na jejich N-konci se nachází signální peptid zodpovídající za import do endoplazmatického retikula, za ním následuje tranzitní peptid připomínající sekvence (transit peptid-like sequence), které hrají roli při transportu proteinů z endomembránového systému k samotnému plastidu (van Dooren et al. 2001).

Signální peptid preproteinů cílených do plastidů se svou povahou a strukturou příliš neliší od svých protějšků u jiných organismů. Pokusy dokonce ukazují na funkční kompatibilitu signálních peptidů u Chlorarachniophyta, Cryptophyta a Apicomplexa (Hirakawa et al. 2009).

Sekvence tranzitního peptidu není příliš konzervována ani mezi jednotlivými preproteiny. Dosud není k dispozici mnoho informací o její struktuře a principu funkce. Její typickou vlastností je snížený počet kyselých aminokyselin a naopak mírně zvýšený obsah aminokyselin bazických (Gile and Keeling 2008).

Zajímavé je, že k odlišení proteinů cílených do stromatu plastidu a do PPC u chlorarachniophyt neslouží přídatný signál v podobě fenylalaninu na N-konci tranzitního peptidu jako je tomu u sekundárních plastidů červené linie. U zelené linie vznikl patrně jiný mechanismus, jehož podstata však zatím není známa (Patron and Waller 2007).

Hirakawův tým (Hirakawa et al. 2009) experimentálně zjistil, že k úspěšnému transportu preproteinu do stromatu plastidu je v tranzitním peptidu nutná přítomnost alespoň dvou silně bazických aminokyselin. V ostatních případech byl narušen transport přes vnitřní dvě membrány plastidu a preproteiny lokalizovaly do PPC. Rozhodující byla v tomto případě přítomnost či nepřítomnost a počet těchto aminokyselin, nikoli jejich umístění. Tentýž tým také analyzoval tranzitní peptid konkrétního preproteinu s cílem zjistit, která doména zodpovídá za jeho funkci. V tranzitním peptidu preproteinů značených GFP bylo deletováno postupně šest různých úseků o délce 4-6 aminokyselin. Většina transformovaných buněk nadále bez problému transportovala preproteiny do plastidu, poslední z konstruktů se však na místo určení dostal jen v 10 % případů. Sekvence, kterou představovala deletovaná část peptidu, bez níž transport selhával, se nevyskytovala u jiných zkoumaných preproteinů, u třetiny však byly nalezeny sekvence podobné, většinou umístěné blízko místa štěpení na C-konci tranzitního peptidu.

V navazujícím výzkumu bylo zjištěno, že bipartitní signál nemusí být u všech preproteinů dostačujícím, neboť u proteinu RbcS (malá podjednotka RubisCO) selhával transport do endoplazmatického retikula při delecí určitého úseku uvnitř samotného proteinu. Byla určena přibližná poloha tohoto interního signálu, ale jeho konkrétní podoba a princip signalizace zatím nejsou známy (Hirakawa and Ishida 2010).

#### **4.2.3. Průběh transportu (obr. 5, str. 32)**

Mechanismus transportu proteinů do plastidů chlorarachniophyt je poměrně málo prozkoumán. Mnohé jeho rysy jsou odhadovány na základě podobnosti s apikoplastem skupiny Apicomplexa, který je rovněž vybaven čtyřmi membránami a není přímo napojen na endomembránový systém.

Předpokládá se, že transport preproteinů u chlorarachniophyt také začíná jejich kotranslačním importem do endoplazmatického retikula. Od něj se oddělují vezikuly přepravující plastidové proteiny a splývají s vnější membránou plastidu, čímž se náklad dostává do prostoru mezi třetí

a čtvrtou membránou. Tento děj probíhá pravděpodobně nezávisle na Golgiho aparátu, váčky míří z retikula přímo k cílové organelle. Mechanismus, kterým preproteiny překonávají bariéru tvořenou třetí membránou plastidu, je zatím zcela neznámý (Bolte et al. 2009). Jasnější je průběh transportu přes vnitřní dvě membrány, který zřejmě vypadá obdobně jako u primárních plastidů: je zprostředkován komplexem Toc a Tic, což dokazuje přítomnost genů pro jejich centrální komponenty Toc75 a Tic20 v genomu nukleomorfu *Bigeloviella natans* (Gilson et al. 2006).

### **4.3. Cryptophyta**

#### **4.3.1. Cryptophyta a jejich plastidy**

Cryptophyta je kmen v říši Chromista, jehož zástupci jsou jednobuněční bičíkovci obsahující jeden až dva plastidy, pomocí nichž získávají energii fototrofně či mixotrofně – kombinují fotosyntézu a heterotrofii. Některé druhy fotosyntézu neprovádějí a žijí se pouze heterotrofně, plastid však zcela chybí pouze u rodu *Goniomonas* a u rodu *Chilomonas* se vyskytuje v bezbarvé formě nazývané leukoplast, která neobsahuje pigmenty (Adl et al. 2005). Plastidy cryptophyt vznikly endosymbiotickým pohlcením červené řasy a obklopují je čtyři membrány. Vnitřní dvě patřily původně prokaryotnímu předkovi plastidu, třetí patrně pochází z cytoplazmatické membrány endosymbiotické řasy a čtvrtá je odvozena od hostitelského fagozómu, který pravděpodobně splynul s endoplazmatickým retikulem (Cavalier-Smith 2002). Tato vnější membrána obsahuje ribozomy a bývá označována jako CER (Chloroplast ER). S retikulem a jadernými obaly hostitelské buňky je u některých zástupců dokonce trvale propojena. Společným unikátním rysem cryptophyt a v předchozí kapitole probíraných chlorarachniophyt je přítomnost nukleomorfu v periplastidálním kompartmentu mezi druhou a třetí membránou, který byl původně cytoplazmou endosymbionta.

#### **4.3.2. Signální domény**

Adresová sekvence pro transport do plastidů cryptophyt se nachází na N-konci proteinu a je stejně jako u mnoha jiných sekundárních plastidů bipartitní. Signální peptid slouží ke kotranslačnímu navedení jaderně kódovaných preproteinu do endoplazmatického retikula či CER. Tranzitní peptid zprostředkovává import přes vnitřní dvě membrány plastidu.

Plastidové proteiny jsou u cryptophyt kódovány jak v jádře, tak v menší míře i v nukleomorfu a jsou transportovány buď přímo do plastidu, či do PPC. Lze je tedy rozdělit na tři skupiny podle toho, odkud kam jsou transportovány. Jejich odlišné cesty odráží rozdíly mezi jejich signálními sekvencemi (Gould et al. 2006).

Preproteiny kódované v nukleomorfu se od preproteinů kódovaných v jádře liší nepřítomností signálního peptidu a rovněž krátkým konzervovaným N-koncovým prodloužením tranzitního peptidu. Tranzitní peptidy proteinů kódovaných v nukleomorfu a směřujících do plastidu jsou podobné tranzitním peptidům proteinů primárních plastidů. To je očekávatelné, vzhledem k tomu, že zodpovídají za transport přes tytéž membrány a to z kompartmentu, který dříve býval cytoplazmou organismu s primárním plastidem. Experimentálně bylo dokázáno, že tyto preproteiny z *Guillardia theta* jsou skutečně schopny importu do izolovaných rostlinných plastidů (Wastl and Maier 2000).

Tranzitní peptid proteinů kódovaných v jádře a směřujících z cytoplazmy do plastidu je poměrně standardním tranzitním peptidem sekundárních plastidů červené linie. Na sekvenční úrovni není definován, ale je pro něj typický zvýšený počet kladně nabitých aminokyselin, asparaginu a lysinu obsahuje přibližně dvakrát více než serinu a threoninu (Nassoury and Morse 2004).

Posledním typem jsou tranzitní peptidy proteinů, které jsou rovněž kódovány v jádře, ale cíleny do PPC. Ačkoli tyto proteiny neprocházejí přes vnitřní dvě membrány, jejich tranzitní peptidy jsou překvapivě velmi podobné těm adresujícím proteiny z cytoplazmy do stromatu plastidu. Samotným signálem pro jejich rozlišení je přítomnost či nepřítomnost fenylalaninu (velmi zřídka jiné aromatické aminokyseliny), který se nachází na +1 pozici za N-koncem tranzitního peptidu a je typicky obklopen několika hydrofobními aminokyselinami. Za toto třídění zodpovídá dosud neznámý faktor, nejspíše spolupracující s Hsp70, který v PPC nasedá na vazebná místa na tranzitním peptidu. Proteiny, které tento fenylalanin obsahují, pokračují přes vnitřní membrány, zatímco proteiny, kterým chybí, zůstávají v PPC (Gould et al. 2006).

#### **4.3.3. Průběh transportu (obr. 5, str. 32)**

Ačkoli je vnější membrána plastidů cryptophyt odvozena od endoplazmatického retikula a v některých případech je s ním fyzicky propojená, nelze je považovat za jeden kompartment. CER a ER jsou kontinuální, ale funkčně oddělené a import do každého z nich probíhá na



základě mírně odlišného signálu (Schwartzbach et al. 1998). Na transportu se nepodílí Golgiho aparát, neboť probíhá za přítomnosti brefeldinu A, který jej inhibuje. Transport proteinů může probíhat skrze propojené lumen ER a CER bez nutnosti formování vezikulů (Ishida et al. 2000).

Mechanismus transportu přes zbývající tři membrány je dosud nejasný. Existují dva hlavní modely snažící se navrhnout jeho průběh.

První z modelů navrhuje přítomnost vezikulárního transportu proteinů mezi třetí a druhou membránou. Třetí, původně eukaryotní cytoplazmatická, tedy endo- a exocytózy schopná, membrána obaluje náklad z CER z prostoru mezi vnějšími dvěma membránami a ve váčcích jej přeposílá k druhé membráně. Mezi vnitřními dvěma membránami cryptophyt byly skutečně pozorovány vezikuly (Gibbs 1979). Dalším důkazem je výrazné nabobtnání prostoru mezi třetí a čtvrtou membránou při podání brefeldinu A, který inhibuje vezikulární transport (Wastl and Maier 2000). Transport přes poslední z membrán patrně probíhá pomocí Tic komplexu či jeho části (Nassoury and Morse 2005).

Druhý z modelů navrhuje transport preproteinů sérií na sebe navazujících translokátorů a předpokládá přítomnost duplikovaného Toc komplexu na třetí membráně. Geny pro tento translokátor by v tom případě musely být kódovány v jádře hostitele a nikoli v nukleomorfu. To podporuje studie genomu nukleomorfu *G. theta*, při níž v něm nebyly identifikovány žádné komponenty Toc komplexu, pouze gen pro Tic22 (Douglas et al. 2001).

Oba modely jsou podpořeny důkazy. Navíc stojí za povšimnutí, že v experimentu Wastla a Maiera při němž byl u *G. theta* sledován import různých preproteinů s odstraněnými signálními peptidy do plastidů zbavených vnějších dvou membrán, byl import úspěšný jen u proteinů kódovaných v nukleomorfu, zatímco u proteinů kódovaných v jádře selhával, což svědčí o existenci různých transportních mechanismů pro tyto dvě skupiny proteinů (Wastl and Maier 2000). Těmito různými typy transportu by mohly být právě systémy navrhované ve zmíněných dvou modelech (Nassoury and Morse 2005).

Roli v transportu přes třetí membránu hraje patrně také systém ERAD (ER-Associated Degradation) patřící původně endosymbiontovi. Funkcí ERAD je vyhledávání nesprávně sbalených proteinů syntetizovaných v ER, jejich ubiquitinace a reverzní translokace zpět do cytoplazmy, kde jsou degradovány v proteazómu. Tento proces v mezimembránovém prostoru některých sekundárních plastidů přebírá transportní funkci a analogy proteinů

zodpovídajících za export nefunkčních proteinů ven z ER místo toho provádějí import plastidových proteinů přes třetí membránu. V genomu nukleomorfu *G. theta* byly nalezeny klíčové komponenty této dráhy, je tedy pravděpodobné, že se na transportu také podílí (Sommer et al. 2007).

## **4.4. Haptophyta**

### **4.4.1. Haptophyta a jejich plastidy**

Haptophyta je skupina převážně mořských fototrofních protistů, jejichž charakteristickými znaky jsou dva bičíky, mezi nimiž se nachází haptonema, krátké vlákno podobné bičíku, které však neobsahuje typickou axonemu, a tvorba organických i mineralizovaných šupin kryjících buňku. (Adl et al. 2005).

Jejich plastidy mají, stejně jako plastidy většiny chromist, čtyři obalové membrány, z nichž vnitřní dvě jsou prokaryotního původu, třetí je odvozena od cytoplazmatické membrány endosymbionta a čtvrtá je přímo napojena na endomembránový systém hostitele a tvoří chloroplastové endoplazmatické retikulum (CER). Sesterkou linií haptophyt představuje skupina Cryptophyta, jejíž plastidy byly s největší pravděpodobností nabyty skrze stejnou endosymbiotickou událost. Zajímavé je, že ve fylogenetických analýzách tyto skupiny vykazují jen malou evoluční spřízněnost s Heterokontophyta, kteří byli dříve považováni za jejich blízké příbuzné, a jejich plastidy se jeví příbuzné zeleným řasám, ačkoli jsou členy červené linie (Rice and Palmer 2006). Důležitým rozdílem mezi haptophyty a cryptophyty je ztráta nukleomorfu u haptophyt, ke které patrně došlo velmi brzy po jejich oddělení.

### **4.4.2. Signální domény**

Signální sekvence navigující proteiny do plastidů haptophyt se strukturně příliš neliší od sekvencí ostatních chromist. Hydrofobní signální peptid na N-konci preproteinu zodpovídá za kotranslační import do ER či možná přímo CER. Za ním následující tranzitní peptid je nezbytný pro transport přes vnitřní dvě plastidové membrány, který není definován na úrovni primární struktury, ale typickými vlastnostmi, především celkovým kladným nábojem.

Na +1 pozici od N-konce tranzitního peptidu se nachází fenylalaninový zbytek, který je typickým znakem vlastním proteinů plastidů červené linie. Zatímco u mnoha chromist, například heterokontophyt, je pro import do stromatu plastidu nebytný, u haptophyt je jeho role poněkud oslabena a u dvou třetin preproteinů transportovaných do stromatu nebyl nalezen (Kilian and Kroth 2005).

#### **4.4.3. Průběh transportu (obr. 5, str. 32)**

Mechanismus transportu proteinů do plastidů haptophyt je dosud jen málo probádán a pravděpodobně se neliší od svých obdob u cryptophyt a heterokontophyt. Vzhledem k povaze vnější membrány plastidu začíná rovněž kotranslačním transportem na ER a následně CER či přímo na CER na základě rozeznání signálního peptidu na jeho N-konci.

Transport přes třetí membránu pravděpodobně zprostředkovává ERAD-like mechanismus (SELMA) vzniklý duplikací ERAD dráhy. Zajímavým faktem je, že zatímco tato kopie zprostředkovávající transport do plastidu pochází ze sekundárního červeného endosymbionta, hostitelská kopie ERAD se ve fylogenetických analýzách jeví jako příbuzná zelené linii. Toto platí pro haptophyty a cryptophyty, ale nikoli pro ostatní Chromista (Felsner et al. 2010b).

V jaderném genomu *Emiliana huxleyi* byly identifikovány z endosymbionta pocházející homology klíčových komponent tohoto systému – membránový kanál Der1 a několik ubiquitinačních enzymů. Felsner a jeho tým tyto proteiny exprimovali v rozsivce *P. tricornutum* a pozorovali jeho heterologní lokalizaci. Tyto pokusy zprvu selhávaly kvůli velkému rozdílu v poměru zastoupení CG párů v genomech jednotlivých organismů, po odstranění CG-biasu však proteiny lokalizovaly dle očekávání do periplastidální oblasti, remnantní cytoplazmy endosymbionta. To dokazuje nejen podobnost mechanismu transportu přes třetí membránu, ale také komplementaritu signálů, které zodpovídají za transport jaderně kódovaných proteinů do oblasti mezi druhou a třetí membránou plastidu (Felsner et al. 2010)

Průběh transportu přes vnitřní dvě membrány plastidu haptophyt je dosud neznámý, je ale pravděpodobné, že se na něm podílejí komplexy Tic a Toc typické pro primární plastidy a prokazatelně se vyskytující i u mnohých sekundárních plastidů. Ve druhé membráně plastidu *E. huxleyi* byl identifikován homolog Omp85-like proteinu nalezeného původně u *P. tricornutum*, který je podobný Toc75 a mohl by zastávat jeho funkci (Bullmann et al. 2010)

## 4.5. Heterokontophyta

### 4.5.1. Heterokontophyta a jejich plastidy

Heterokontophyta, spadající do říše Chromista, je značně různorodá skupina sdružující protistní i mnohobuněčné organismy, jejichž společným znakem je výskyt dvou heterokontních bičíků, z nichž přední je obvykle vybaven mastigonematy a zadní je hladký, alespoň u některého životního stadia (Adl et al. 2005). Členové této skupiny původně měli sekundární červený plastid, u některých však došlo k jeho druhotné ztrátě. Fotosyntetické organismy se zachovaným a používaným sekundárním plastidem sdružuje vnitřní monofyletická skupina Ochrophyta (Riisberg et al. 2009).

Plastidy heterokontophyt vznikly sekundární endosymbiózou s toutéž červenou řasou a obalují je čtyři membrány, jejichž evoluční původ je stejný jako u ostatních čtyřmembránových sekundárních plastidů: vnitřní dvě jsou původem prokaryotní, třetí je bývalou cytoplazmatickou membránou eukaryotního endosymbionta a čtvrtá je odvozena od hostitelova fagozómu propojeného s endoplazmatickým retikulem. Jejich vnější plastidová membrána je kontinuální s ER a obsahuje ribozomy a označuje se také jako CER (Chloroplast ER). Plastid tedy leží v lumen endoplazmatického retikula (Cavalier-Smith 2000).

### 4.5.2. Signální domény

Adresová doména plastidových proteinů u heterokontophyt je rovněž bipartitní (Lang et al. 1998). Signální peptid zprostředkovává průchod přes vnější membránu, která je *de facto* membránou endoplazmatického retikula. Za ním následuje tranzitní peptid, který obsahuje stroma-targetovací doménu (STD), případně ještě thylakoid-targetovací doménu (TTD).

I když je vnější membrána plastidu s ER propojená, signální peptid navádějící preprotein přes tuto membránu není shodný se signálním peptidem ostatních proteinů směřovaných do endomembránového systému. To dokazuje pokus provedený Aptovým týmem na rozsivce *Phaeodactylum tricornutum*. Bylo zjištěno, že lokalizace GFP vybaveného klasickým signálním peptidem a GFP vybaveného signálním peptidem pocházejícím z preproteinu adresovaného na plastidu se liší, v prvním případě vstupuje protein do klasického ER, ve druhém je lokalizován mezi vnějšími membránami plastidu (Apt et al. 2002).

Typickou vlastností tranzitního peptidu je zvýšený obsah alaninu a hydroxylovaných aminokyselin a naopak minimální podíl aminokyselin kyselých a přítomnost několika kladně nabitých reziduí, které způsobují jeho celkový kladný náboj. Právě ten je stěžejním pro jeho funkci, což dokazují pokusy na *P. tricornutum*, při nichž po substituci kladně nabitých aminokyselin za záporně nabitě transport selhával, ale zároveň úspěšně probíhal po substituci za jiné, ale rovněž kladně nabitě aminokyseliny (Felsner et al. 2010).

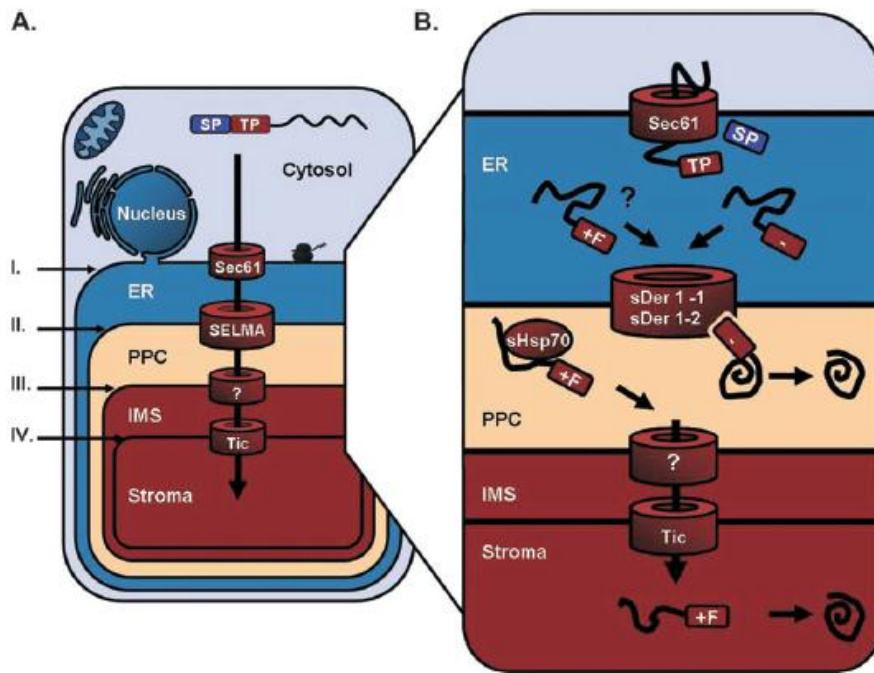
Signálem pro import do stromatu je přítomnost fenylalaninu na +1 pozici tranzitního peptidu. Zatímco mnohé jiné organismy s červeným sekundárním plastidem jeho přítomnost nevyžadují tak striktně, u Heterokontophyta je tento signál esenciální a vyskytuje se téměř u všech proteinů cílených do stromatu plastidu (Kilian and Kroth 2005).

#### **4.5.3. Průběh transportu (obr. 3)**

Prvním krokem transportu proteinů do plastidů heterokontophyt je průchod přes vnější plastidovou ER-like membránu, který zprostředkovává signální peptid a Sec61 translokon. Takto se preprotein dostává do prostoru mezi čtvrtou a třetí membránou, tedy vlastně lumen CER (Chaal et al. 2003). Možné rovněž je, že některé preproteiny vybavené signálním peptidem, který je naviguje do klasického endoplazmatického retikula, se k plastidu dostávají přes propojená lumen ER a CER (Ishida 2000).

Transport přes třetí plastidovou membránu probíhá ERAD-like mechanismem, který se pravděpodobně vyskytuje u všech čtyřmembránových plastidů červené linie, ale není u nich dosud podrobně prozkoumán. Tento transportní systém vznikl duplikací dráhy ERAD (Er-Associated Degradation), která původně patřila endosymbiontovi (Agrawal et al. 2009) a je označován jako SELMA (Symbiont-specific ERAD-like Machinery) (Hempel et al. 2009). Například v genomu *P. tricornutum* byly identifikovány dvě kopie tohoto systému, přičemž proteiny jednoho ze setů byly vybaveny plastidovou adresovou sekvencí (Hempel et al. 2010). Proteinem, který funguje jako membránový translokátor je Der1 (Hempel et al. 2009).

Pro funkci ERAD je nezbytný ubiquitin a stejně je tomu pravděpodobně i u ERAD-like transportního systému. Ve třetí plastidové membráně a mezimembránovém prostoru pod ní byly skutečně nalezeny s ubiquitinem pracující enzymy: ubiquitin ligáza ptE3P a de-ubiquitináza ptDUP (Hempel et al. 2010).



**Obr. 3** Schéma organizace membrán a transportu proteinů do plastidu rozsivky *Phaeodactylum tricornutum*. Vnější plastidová membrána je propojena s ER a jadernými obaly hostitele, transport skrz ni probíhá po rozeznání signálního peptidu a prostřednictvím kanálu Sec61. Transport přes třetí membránu zprostředkovává systém SELMA (Symbiont-specific ERAD-like machinery) odvozený od dráhy ERAD s centrálním kanálem tvořeným proteiny sDer1-1 a sDer1-2. Tento systém pravděpodobně také hraje roli v rozlišení stromálních proteinů podle fenylalaninového signálu. Transport přes vnitřní dvě membrány pravděpodobně probíhá podobně jako u rostlin, za přispění molekul homologických s komponenty komplexů Toc a Tic (převzato z Hempel et al. 2009).

Transport přes vnitřní dvě membrány patrně probíhá podobným mechanismem jako u rostlin. Na vnitřní membráně se nachází systém Tic či jeho část (van Dooren et al. 2008; Bolte et al. 2009), translokátor druhé membrány byl dlouho neznámý, v žádném z analyzovaných organismů nebyl nalezen jakýkoli homolog proteinů komplexu Toc (Chaal and Green 2005). V současnosti se ukazuje, že by tímto chybějícím článkem mohl být Omp85-like protein, jehož přítomnost byla prokázána v druhé plastidové membráně *P. tricornutum* a který se podobá rostlinnému Toc75. Sekvenčním porovnáním s tímto nově indentifikovaným proteinem byl nalezen jeho další homolog u rozsivky *Thalassiosira pseudonana* (Bullmann et al. 2010).

## 4.6. Dinoflagellata

### 4.6.1. Dinoflagellata a jejich plastidy

Dinoflagellata je skupina protistů v říši Chromista. Jejich společným znakem je atypické jádro zvané dinokaryon, které neobsahuje histony a jeho chromatin zůstává kondenzovaný i během interfáze, u většiny je také přítomna théka tvořená celulóзовými destičkami (Adl et al. 2005). Dinoflagellata mají plastidy a živiny získávají většinou mixotrofně, kombinací fotosyntézy a fagotrofie, pouze někteří jsou výhradně heterotrofní. Unikátním rysem dinoflagelátů je velká různorodost podob a původů jejich plastidů. Předpokládá se, že jejich ancestrálním plastidem byl sekundární plastid pocházející z červené linie, který obsahoval chlorofyly a a c a xantofyl peridin. Druhy u nichž je tento plastid zachován se označují jako peridin obsahující (peridin-containing) Dinoflagellata. U jiných dinoflagelátů však došlo k jeho ztrátě či častěji nahrazení dalším plastidem, který byl získán terciární endosymbiózou s jinými chromisty: haptophytem, cryptophytem, rozsivkou nebo heterokontem *Dictyocha* (Keeling 2009). Míra redukce pohlcených eukaryotních buněk a genetické integrace těchto plastidů je u různých skupin dinoflagelátů různá. U jiných skupin nalézáme také kleptoplastidy pocházející z cryptophyt, které se nereplikují spolu s hostitelem a musí být průběžně doplňovány (Nassoury et al. 2003).

Zvláštním, ojedinělým případem je plastid rodu *Lepidodinium*, který byl získán sekundární endosymbiózou se zelenou řasou.

V této práci se budu zabývat sekundárními plastidy dinoflagelátů, tedy evolučně původními peridin obsahujícími plastidy červené linie, ale také zeleným plastidem *Lepidodinia*.

Plastidy peridin obsahujících dinoflagelátů jsou obaleny třemi membránami z nichž vnitřní dvě pochází z prokaryotního předka plastidu a jsou obdobou dvou membrán primárního plastidu, a třetí je odvozena od fagozómu hostitele, tedy jeho endomembránového systému. Tato vnější membrána je však od ER oddělená a neobsahuje ribozómy (Chaal and Green 2005).

Plastid *Lepidodinia* byl nabyt endosymbiózou se zelenou řasou a v hostitelské buňce nahradil původní červený plastid. Dosud není jasné, za jakých okolností k této unikátní události došlo. Organismus mohl ztratit schopnost fotosyntézy a následně i původní plastid a druhotně přejít k heterotrofii a až po určité době pohlit dalšího fotosyntetického endosymbionta. Přejít však mohl být i plynulý a je dokonce možné, že spolu tyto dva různé plastidy nějaký čas

koexistovaly uvnitř jedné buňky. Výsledkem je chimerický plastid, který využívá mnohé jaderně kódované geny pocházející ze svého předchůdce. Je obalen čtyřmi membránami, z nichž vnější je odvozena od endoplazmatického retikula hostitele (Minge et al. 2010).

#### **4.6.2. Signální domény**

Plastidové preproteiny peridin obsahujících dinoflagelátů lze rozdělit na dvě zhruba stejně velké třídy podle podoby jejich adresové sekvence, která může být bipartitní či tripartitní. Lokalizace proteinů obou tříd se kryje a není jasné, z jakého důvodu se jejich adresy liší. Je možné, že zde existují dva různé mechanismy či dokonce odlišné transportní dráhy (Patron et al. 2005). Jako podmnožinu třídy první lze chápat ještě jednu skupinu proteinů, někdy označovanou jako třetí třídu, jejichž odlišnost se odvíjí od lokalizace do thylakoidů, nikoli stromatu (Bolte et al. 2009).

Signální peptid je u obou tříd stejný. Jeho primární struktura není definována a může být různá, jeho zásadní vlastností je hydrofobní povaha, která zodpovídá jeho rozeznání a kotranslační navedení proteinu do endoplazmatického retikula.

Druhá část signálu, tranzitní peptid, je rovněž společná oběma třídám. Jedná se o region bohatý na hydroxylované aminokyseliny, především serin a threonin, který je odhalen po odstřížení signálního peptidu v lumen ER a zodpovídá za import přes membrány plastidu (Nassoury and Morse 2004).

Třetí částí, která chybí u preproteinů druhé třídy a je přítomna v preproteinech první třídy, je druhá hydrofobní oblast nacházející se za tranzitním peptidem. Rozpoznání tohoto regionu vede k zastavení transferu do lumen ER a způsobí, že proteiny jím vybavené jsou z ER do vnější membrány plastidu transportovány ve formě integrálního membránového proteinu.

Důležitou částí signální domény, která je opět společná oběma třídám a je v podstatě součástí tranzitního peptidu, je čtyři aminokyseliny dlouhý motiv s fenylalaninem v hydrofobním kontextu na jeho N-konci. Jedná se o velmi starý znak, který se vyskytuje u červených řas a glaucophyt, do poměrně velké míry u sekundárních plastidů od nich odvozených, ale nikoli u zelených plastidů, ať již primárních či sekundárních (Patron et al. 2005).



Proteiny směřované do thylakoidů, tedy proteiny třídy třetí, obsahují vedle všech součástí charakteristických pro první třídu ještě jeden hydrofobní region nacházející se na C-konci celé adresové domény (Bolte et al. 2009).

Signální domény proteinů plastidu *Lepidodinia* jsou pozoruhodné. Jsou rovněž složeny ze signálního a tranzitního peptidu, svým složením a vlastnostmi se však neliší ani svým protějškům v peridin obsahujících dinoflagelátech či jiných Chromista, ani zeleným řasám. Jejich tranzitní peptid je ve srovnání s ostatními velmi chudý na serin a threonin a obsahuje výrazně vyšší množství kyselých aminokyselinových reziduí. Na jeho N-konci se navíc nachází abnormálně dlouhá hydrofilní oblast. Hydrofobní stop-transfer sekvence se u *Lepidodinia* nevyskytuje (Minge et al. 2010).

Je zřejmé, že s výměnou plastidů u *Lepidodinia* přichází i nový typ signální sekvence místo toho, aby byla použita již zavedená. Tento fakt nahrává hypotéze, podle níž spolu původní červený a nový zelený plastid určitou dobu koexistovaly a soupeřily a tudíž bylo nutno oddělit produkty směřující do každého z nich (Patron et al. 2005).

#### **4.6.3. Průběh transportu**

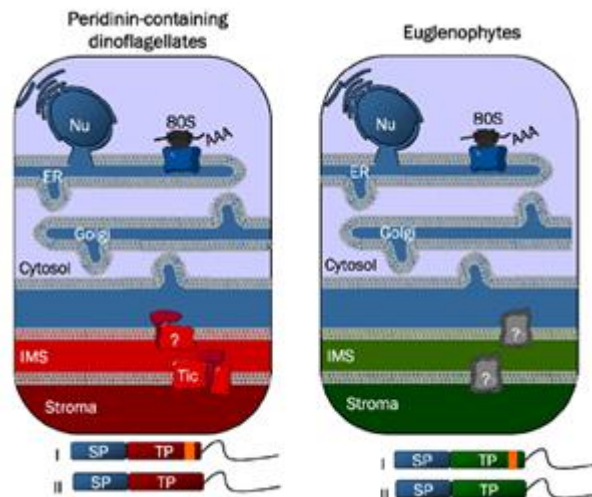
Prvním krokem transportu proteinů do plastidů peridin obsahujících dinoflagelátů je, stejně jako u všech organismů se sekundárními plastidy, kotranslační import do endoplazmatického retikula. Preproteiny druhé třídy přitom procházejí do lumen ER celé, zatímco preproteiny první třídy zůstávají po dobu transportu k plastidu integrovány v membráně tak, že podstatná část proteinu směřuje do cytoplazmy (Nassoury and Morse 2004).

Následně probíhá vezikulární transport po sekreční dráze, do Golgiho aparátu, odkud se opět oddělují váčky, které směřují k plastidu a splývají s jeho vnější membránou. Jejich obsah je tak vyložen do prostoru mezi třetí a druhou membránou, proteiny integrované v membráně směřují do tohoto kompartmentu svým tranzitním peptidem.

Dosud není známo, jakým způsobem jsou proteiny z endomembránového systému naváděny k plastidu. Pokusy ukazují, že plastidový protein bez tranzitního peptidu je secernován z buňky. Vnější membrána plastidu může tedy být odbočkou sekreční dráhy, po níž jsou proteiny navigovány specifickým targetingem z Golgiho aparátu, nebo přímo její součástí,

přes kterou procházejí všechny proteiny sekreční dráhy a pouze ty vybavené tranzitním peptidem zde zůstávají (Nassoury et al. 2003).

Proteiny jsou rozeznávány a translokovány přes zbývající membrány dosud neznámými mechanismy. Ty by mohly být podobné mechanismům transportu do primárních plastidů, neboť signálního peptidu zbavený thylakoidální protein dinoflageláta *Heterocapsa triquetra* byl při pokusu úspěšně transportován do rostlinného plastidu (Chaal and Green 2005).



**Obr. 4** Porovnání uspořádání obalů plastidu a signálních sekvencí plastidových proteinů u peridin obsahujících dinoflagelátů a euglenophyt. Plastidy obou skupin jsou obaleny třemi membránami. V transportním mechanismu obou skupin hraje roli vezikulární transport částí sekreční dráhy včetně Golgiho aparátu. Preproteiny směřující do plastidu lze u obou skupin rozdělit na dvě hlavní třídy lišící se přítomností či nepřítomností stop-transfer signálu (na obrázku vyznačen oranžově), díky němuž jsou některé proteiny transportované ve vezikulech ve formě integrované do membrány (převzato a upraveno z Bolte et al. 2009).

Průběh transportu proteinů do plastidů peridin obsahujících dinoflagelátů nápadně připomíná tentýž děj u euglenophyt (obr. 4). Tyto skupiny jsou však zcela nepříbuzné a jejich plastidy jsou odlišného původu. Jedná se o zajímavý příklad konvergentní evoluce na molekulární úrovni: vzniklé mechanismy odrážejí principy buněčné biologie, ale nikoli fylogenezi.

Nesmírně pozoruhodné je, že evolučních konvergencí mezi skupinami Dinoflagellata a Euglenozoa existuje celá řada. Genomy obou skupin mají neobvyklé rysy, z nichž některé se podobají spíše tím, že se výrazně odchyľují od „eukaryotního standardu“ (atypická velikost a genová denzita genomu, přítomnost různých modifikovaných nukleotidů), ale jiné jsou překvapivě podobné: obě skupiny provádějí zvláštní trans-splicing, jímž na RNA transkripty

připojují konzervovaný leader, a jejich transkripce může probíhat polycistronně, což je u eukaryot zcela nevídaným jevem. V mitochondriálních genomech obou skupin se vyskytuje velké množství genových fragmentů a vysoká míra RNA-editingu. Mnozí zástupci euglenozoi a dinoflagelátů jsou si podobní i dravým způsobem života a morfologií s ním částečně související: tvarem těla, výskytem epixenosomů, umístěním jednoho z bičíků v rýze a vyztužením bičíku paraxonemální, resp. paraflagelární tyčí (Lukeš et al. 2009).

## 4.7. Apicomplexa

### 4.7.1. Apicomplexa a jejich plastid

Apicomplexa je skupina protist v říši Chromista. Společnými znaky jejích členů je parazitická (většinou intracelulárně parazitická) životní strategie a s ní související morfologie – přítomnost apikálního komplexu, aparátu sloužícího k průniku do hostitele. Mezi Apicomplexa patří jeden z medicínsky nejvýznamnějších organismů vůbec, původce malárie *Plasmodium*, dále například *Cryptosporidium* a pozoruhodný, v lidské populaci vysoce rozšířený parazit *Toxoplasma gondii*.

Důležitou charakteristikou apicomplex je přítomnost apikoplastu, což je sekundární plastid nabytý endosymbiosou s červenou řasou, který ale při přechodu hostitele k parazitickému způsobu života druhotně ztratil schopnost fotosyntézy včetně genů nutných pro syntézu fotosyntetických pigmentů. I přes ztrátu své hlavní funkce je pro buňku esenciální, neboť v něm probíhají některé důležité biosyntetické dráhy. To jej činí potenciálním cílem antimalarických léčiv (Maréchal and Cesbron-Delauw 2001). Některá apicomplexa, například gregariny a *Cryptosporidium*, apikoplast neobsahují, pravděpodobně u nich došlo k jeho kompletní sekundární ztrátě.

V souladu se svým sekundárně endosymbiotickým původem je tento plastid obalen větším počtem membrán, který je však u apicomplex dosud nejasný a možná variabilní. Některé zdroje uvádějí pro apikoplast *Plasmodia* čtyři membrány, jiné tři. Možné rovněž je, že počet membrán apikoplastu je u různých jedinců téhož druhu různý. Obdobná situace platí u *Toxoplasmy* (Hopkins et al. 1999; McFadden 2011; Köhler 2005).

Vnitřní dvě membrány jsou analogické s membránami primárního plastidu, vnější membrána je odvozena od endomembránového systému sekundárního hostitele. Ačkoli je to u

čtyřmembránových sekundárních plastidů běžné, u apicomplex není přímo napojena na endoplazmatické retikulum a neobsahuje ribozómy. Třetí membrána, v některých případech zachována, v některých druhotně ztracena, nejspíše odpovídá cytoplazmatické membráně eukaryotního endosymbionta.

#### 4.7.2. Signální domény

Adresová sekvence pro transport do apikoplastu se nachází na N-konci preproteinu a standardně je rovněž bipartitní. Signální peptid zodpovídá za translokaci z cytoplazmy do endoplazmatického retikula a má hydrofobní povahu, za ním následuje tranzitní peptid.

Charakteristickou vlastností tranzitního peptidu apicomplex je vysoký obsah bazických a velmi nízký obsah kyselých aminokyselin, toto platí obzvláště pro jeho N-koncovou část. Narozdíl od tranzitního peptidu rostlinného typu neobsahuje zvýšené množství hydroxylovaných aminokyselin. Tranzitní peptid *P. falciparum* je nejbohatší na lysin a asparagin, obohacený je rovněž o izoleucin. Malých nepolárních aminokyselin, glycinu, alaninu, valinu a leucinu obsahuje naopak menší množství (Foth et al. 2003). Nejčastějšími aminokyselinami tranzitního peptidu *T. gondii* jsou lysin a arginin (Ralph et al. 2004). Stěžejní vlastností tranzitního peptidu je jeho celkový kladný náboj, obzvláště u jeho N-konce. Konkrétní počet a pozice aminokyselin není zásadní.

Tranzitní peptid apicomplex také obsahuje velké množství vazebných míst pro chaperon Hsp70, která jsou koncentrována především ve dvou oblastech: dle počítačových predikcí podle sekvence proteinů *P. falciparum* okolo 13. aminokyseliny a v regionu mezi 23. a 36. aminokyselinou. Tato vazebná místa hrají určitou roli v transportu, což dokládá pokus, při němž u proteinů se zachovanými charakteristickými vlastnostmi tranzitního peptidu, ale se substitucemi, které narušily Hsp70-vazebná místa, docházelo v 90 % případů k sekreci do parazitoformní vakuoly obklopující parazita v hostiteli. Jelikož transport probíhal, ale pouze v omezené míře, lze usuzovat, že Hsp70-vazebná místa pro něj nejsou nezbytná, ale výrazně zvyšují jeho spolehlivost a efektivitu (Foth et al. 2003).

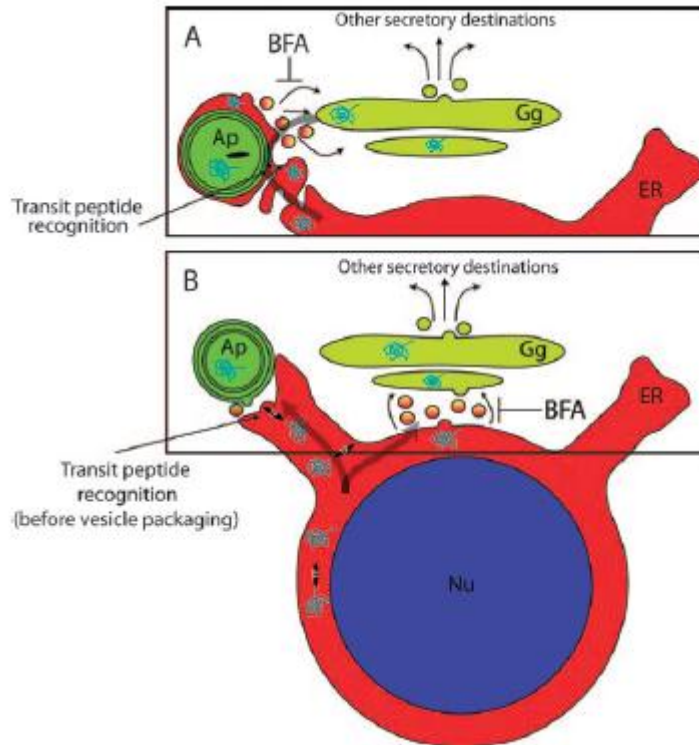
V tranzitním peptidu se u většiny proteinů nachází ještě přídatný signál v podobě fenylalaninu či méně často jiné aromatické aminokyseliny na +1 pozici (Patron and Waller 2007).

Preproteinu chybí druhá hydrofobní oblast představující stop-transfer signál, která se vyskytuje u plastidů euglenophyt a peridin obsahujících dinoflagelátů, které jsou obaleny třemi membránami. Preprotein tedy do lumen ER vstupuje celý a není s ním manipulováno ve formě do membrány integrovaného proteinu.

Některým proteinům část typické adresové sekvence chybí, často se jedná o membránové proteiny, které by mohly obsahovat kryptický signál ukrytý v transmembránové doméně (Agrawal and Striepen 2010). Takovýmto proteinem je například FtsH1 *T. gondii*, AAA-proteáza lokalizovaná na plastidových membránách, jejíž preprotein neobsahuje bipartitní signál. Bylo dokázáno, že její mutantní forma zbavená peptidázové domény není schopna translokace a zůstává v ER, část signálu nutného pro transport tedy musí být uvnitř samotného proteinu (Karnataki et al. 2007). Podobným případem je thioredoxin-like protein ATrx1 *T. gondii*, který je asociován s membránami a lokalizuje do vnějších částí apikoplastu a neobsahuje tranzitní peptid. Do plastidu lokalizuje za pomoci signálního peptidu a esenciálního 160 aminokyselin dlouhého regionu za ním, který ale tranzitní peptid nepřipomíná (DeRocher et al. 2008).

### **4.7.3. Průběh transportu**

Prvním krokem transportu proteinu do apikoplastu je jeho kotranslační import do endoplazmatického retikula, odkud po odstrižení signálního peptidu pokračuje do samotné organely. Vezikuly s nákladem proteinů se oddělují od ER a směřují přímo k apikoplastu s jehož vnější membránou splývají, možná za pomoci SNARE proteinů (Agrawal and Striepen 2010). Dráha nepostupuje přes Golgiho aparát. To dokazuje pokus, při němž u *P. falciparum* transport do apikoplastu probíhal i za přítomnosti brefeldinu A, který blokuje komunikaci mezi ER a Golgiho aparátem (Tonkin et al. 2008). Jakým způsobem jsou v ER proteiny tříděny a odesílány na základě toho, zda směřují do apikoplastu či dále po sekreční dráze není známo. Vysvětlení poskytuje představa apikoplastu jakožto součásti sekreční dráhy, přes kterou postupují všechny proteiny translatované na ER. Translokační mechanismus na druhé vnější membráně apikoplastu by rozeznával a transportoval pouze preproteiny vybavené tranzitním peptidem, ostatní proteiny by v oddělujících se vezikulech pokračovaly sekreční drahou dál (Joiner and Roos 2002) (obr. 5).



**Obr. 5** Dva modely transportu proteinů přes vnější membránu apikoplastu. A) Podle prvního modelu se apikoplast nachází v lumen ER a jeho povrch přichází do kontaktu se všemi proteiny v tomto kompartmentu. Rozeznány a importovány jsou však pouze ty vybavené tranzitním peptidem, ostatní pokračují po klasické sekreční dráze, ve vezikulech ke Golgiho aparátu. B) Druhý model navrhuje transport plastidových proteinů z ER ve vezikulech bez průchodu přes Golgiho aparát a předpokládá existenci mechanismu třídícího proteiny podle přítomnosti či nepřítomnosti tranzitního peptidu v ER či v mezimembránovém prostoru apikoplastu (převzato z Tonkin et al. 2008).

Transport přes druhou vnější membránu pravděpodobně probíhá ERAD-like mechanismem odvozeným od endosymbiontova ERAD systému. U *T. gondii* bylo zjištěno několik kopií základních komponent ERAD, včetně membránového translokátoru Der1, jejichž lokalizace je dvojitá: část plní svou standardní funkci v endoplazmatickém retikulu, část se nachází ve třetí membráně apikoplastu a mezimembránovém prostoru nad ní (Hempel et al. 2009; Spork et al. 2009).

Transport přes vnitřní membránu je nejspíše zprostředkován obdobou rostlinného komplexu Tic, u většiny zkoumaných apicomplex byly nalezeny homology Tic20 a Tic22, pouze u *Cryptosporidia* nikoli, což není nijak překvapivé, vzhledem k tomu, že plastid druhotně ztratilo (van Dooren et al. 2008). Podstata transportu přes druhou membránu je méně jasná,

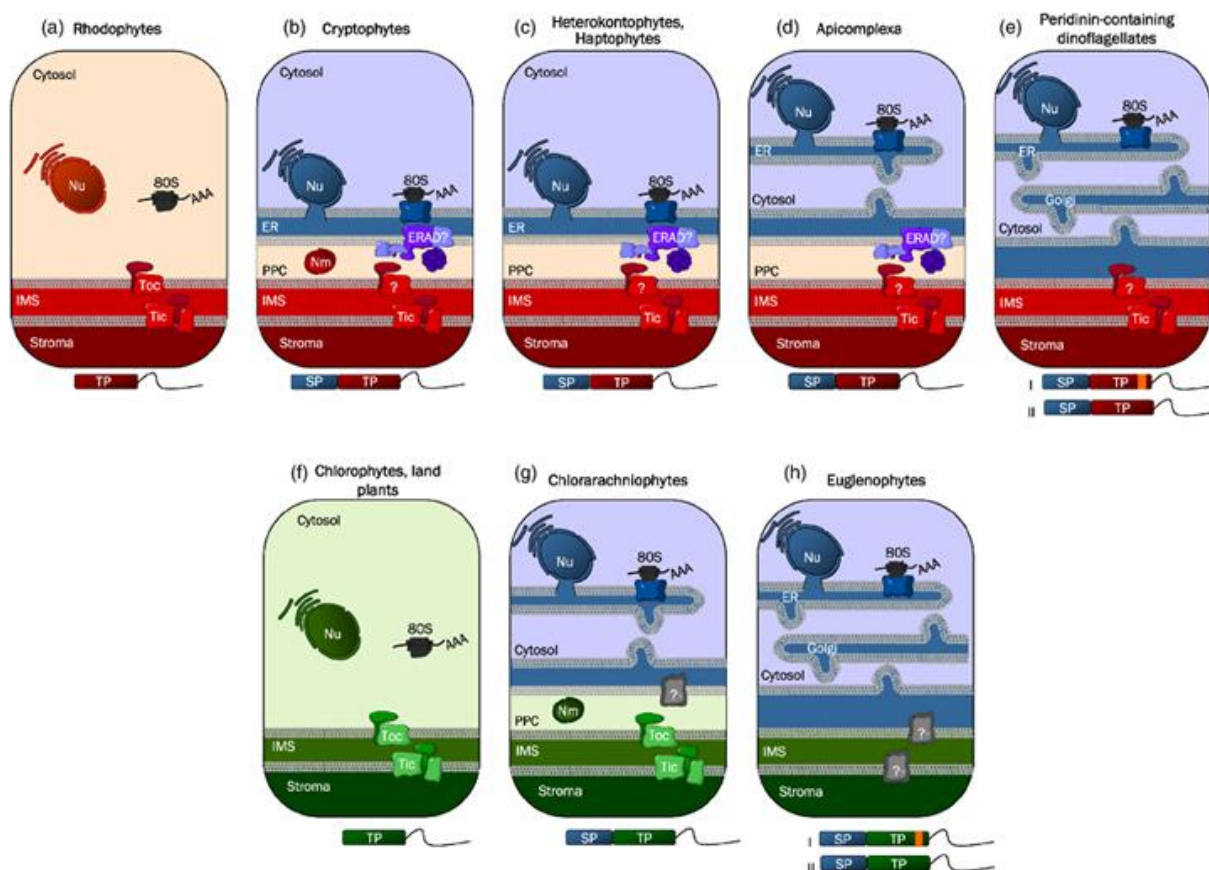
neboť komponenty Toc systému jsou u apicomplex k nalezení jen stěží, pouze u *P. falciparum* byl identifikován homolog Toc34, není však známo, zda je zachována jeho funkce (Waller and McFadden 2005). Je možné, že jsou tyto geny natolik diverzifikovány, že již nejsou algoritmy rozeznány jako homology, nebo došlo k jejich ztrátě a nahrazení jiným translokátorem, například další kopií Der1 (Tonkin et al. 2008).

## 5. Závěr

Organismy vybavené sekundárními plastidy tvoří velkou a rozmanitou skupinu. Jejich plastidy pochází z několika nezávislých endosymbiotických událostí, jejichž skutečný počet není dosud s jistotou znám. Obzvláště u skupiny Chromista jsou neustále odhalována nová fakta a navrhovány nové hypotézy o jejich původu a vzájemném vztahu.

Mechanismus transportu jaderně kódovaných proteinů do těchto plastidů se mezi jednotlivými skupinami liší, jeho základní principy jsou však stejné, neboť vycházejí z jejich endosymbiotického původu a obecných vlastností (obr. 6). Transport přes vnitřní dvě membrány plastidu je pravděpodobně podobný transportu do plastidů primárních, je závislý na přítomnosti tranzitního peptidu, jehož vlastnosti se však u jednotlivých skupin do různé míry liší, a u některých organismů jej prokazatelně zajišťují translokátory homologní s Toc/Tic systémem známým z primárních plastidů. U mnoha však žádné homology komponent Toc a Tic identifikovány nebyly a importní mechanismus je stále nejasný či zcela neznámý. Vnější membrána sekundárních plastidů je odvozena od endomembránového systému hostitele a homologní, někdy přímo fyzicky propojená, s endoplazmatickým retikulem. Transport skrze ni proto probíhá podobně jako začátek sekreční dráhy. Na základě rozeznání signálního peptidu cytosolickými faktory je protein kotranslačně importován do ER, odkud se do plastidu dostává buď přímo (v případě membrán propojených s ER) či vezikulárním transportem, do něž může a nemusí být zapojen i Golgiho aparát. Druhá vnější membrána, která není zachována u všech sekundárních plastidů, často využívá transportní systém odvozený od degradační dráhy ERAD, v některých případech ale také dosud neznámé, s ERAD nesouvisející translokátory.





**Obr. 6** Shrnutí a srovnání uspořádání obalů plastidů a signálních domén do nich transportovaných proteinů u primárních a sekundárních plastidů červené a zelené linie. Do primárních plastidů jsou proteiny navigovány na základě přítomnosti tranzitního peptidu (TP), jejich import přes membrány zajišťují translokační systémy Toc a Tic. Sekundární plastidy obsahují o jednu až dvě membrány více, vnější je někdy asociována s ER, někdy obsahuje ribozomy a transport plastidových proteinů skrz ni probíhá kotranslačně za přispění signálního peptidu (SP), který tvoří druhou část celé bipartitní targetovací sekvence (BTS). Na transportu přes třetí membránu čtyřmembránových plastidů chomist se podílí systém někdy nazývaný SELMA, který byl odvozen od degradační dráhy ER (ERAD). V transportu proteinů do plastidů euglenophyt a peridin obsahujících dinoflagelátů se uplatňuje vezikulární transport, některé proteiny jsou takto přenášeny v transmembránové formě a proto obsahují ještě přídatný stop-transfer signál (ST, na obrázku vyznačený oranžově). Ve vnitřních dvou membránách mnohých sekundárních plastidů byly identifikovány homology některých komponent komplexů Toc a Tic, je tedy pravděpodobné, že transport probíhá jejich prostřednictvím a to podobně jako u primárních plastidů. Některé části celé mašinerie nejsou doposud známy či blíže prozkoumány - na obrázku jsou označeny otazníky (převzato z Bolte et al. 2009).

Některé mechanismy v transportu proteinů do sekundárních plastidů se nápadně podobají u organismů, které jsou zcela nepříbuzné a jejich plastidy jsou rovněž odlišného původu: podobné systémy vznikají z funkčních důvodů a nikoli na základě společné evoluce. Takovéto případy evoluční konvergence lze nalézt mezi Cryptophyta a Chlorarachniophyta, skupinami v jejichž plastidech bylo zachováno zredukované jádro sekundárního endosymbionta a průběh transportu u nich odráží vlastnosti a nároky tohoto kompartmentu, a mezi Euglenophyta a peridin obsahujícími dinoflageláty, jejichž jinak nepříbuzné plastidy jsou obaleny třemi membránami namísto běžnějších čtyř.

V poznání transportu do sekundárních plastidů existuje množství málo jasných či zcela neprobádaných oblastí, jejichž výzkum by mohl potvrdit zatím nepodložené hypotézy – a nebo naopak odhalit zcela nové, zatím netušené molekuly a mechanismy. Jedním z takových bílých míst jsou vnitřní membrány plastidů skupiny Euglenophyta, o jejichž translokačních systémech není zatím známo téměř nic. Tento fakt, společně se zmíněnou pozoruhodnou evoluční konvergencí s některými dinoflageláty, činí fotosyntetické euglenidy velmi zajímavým objektem studia. Právě jejich plastidům a plastidovým proteinům – zejména membránovým, zapojeným do transportu – bych se chtěla věnovat ve své magisterské práci.

## Seznam použité literatury

**Adl SM, Simpson AG, Farmer MA, Andersen RA, Anderson OR, Barta JR, Bowser SS, Brugerolle G, Fensome RA, Fredericq S, James TY, Karpov S, Kugrens P, Krug J, Lane CE, Lewis LA, Lodge J, Lynn DH, Mann DG, McCourt RM, Mendoza L, Moestrup O, Mozley-Standridge SE, Nerad TA, Shearer CA, Smirnov AV, Spiegel FW, Taylor MF.** The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. *J Eukaryot Microbiol.* 2005 Sep-Oct;52(5):399-451.

**Agrawal S, van Dooren GG, Beatty WL, Striepen B.** Genetic evidence that an endosymbiont-derived endoplasmic reticulum-associated protein degradation (ERAD) system functions in import of apicoplast proteins. *J Biol Chem.* 2009 Nov 27;284(48):33683-91. Epub 2009 Oct 6.

**Agrawal S, Striepen B.** More membranes, more proteins: complex protein import mechanisms into secondary plastids. *Protist.* 2010 Dec;161(5):672-87. Epub 2010 Oct 30.

**Apt KE, Zaslavkaia L, Lippmeier JC, Lang M, Kilian O, Wetherbee R, Grossman AR, Kroth PG.** In vivo characterization of diatom multipartite plastid targeting signals. *J Cell Sci.* 2002 Nov 1;115(Pt 21):4061-9.

**Baurain D, Brinkmann H, Petersen J, Rodríguez-Ezpeleta N, Stechmann A, Demoulin V, Roger AJ, Burger G, Lang BF, Philippe H.** Phylogenomic evidence for separate acquisition of plastids in cryptophytes, haptophytes, and stramenopiles. *Mol Biol Evol.* 2010 Jul;27(7):1698-709. Epub 2010 Mar 1.

**Benz JP, Soll J, Bölter B.** Protein transport in organelles: The composition, function and regulation of the Tic complex in chloroplast protein import. *FEBS J.* 2009 Mar;276(5):1166-76.

**Bolte K, Bullmann L, Hempel F, Bozarth A, Zauner S, Maier UG.** Protein targeting into secondary plastids. *J Eukaryot Microbiol.* 2009 Jan-Feb;56(1):9-15.

**Bullmann L, Haarmann R, Mirus O, Bredemeier R, Hempel F, Maier UG, Schleiff E.** Filling the gap, evolutionarily conserved Omp85 in plastids of chromalveolates. *J Biol Chem.* 2010 Feb 26;285(9):6848-56. Epub 2009 Dec 30.

**Cavalier-Smith T.** Principles of protein and lipid targeting in secondary symbiogenesis: euglenoid, dinoflagellate, and sporozoan plastid origins and the eukaryote family tree. *J Eukaryot Microbiol.* 1999 Jul-Aug;46(4):347-66.

**Cavalier-Smith T.** Membrane heredity and early chloroplast evolution. *Trends Plant Sci.* 2000 Apr;5(4):174-82.

- Cavalier-Smith T.** Chloroplast evolution: secondary symbiogenesis and multiple losses. *Curr Biol.* 2002 Jan 22;12(2):R62-4.
- Chaal BK, Ishida K, Green BR.** A thylakoidal processing peptidase from the heterokont alga *Heterosigma akashiwo*. *Plant Mol Biol.* 2003 May;52(2):463-72.
- Chaal BK, Green BR.** Protein import pathways in 'complex' chloroplasts derived from secondary endosymbiosis involving a red algal ancestor. *Plant Mol Biol.* 2005 Feb;57(3):333-42.
- DeRocher AE, Coppens I, Karnataki A, Gilbert LA, Rome ME, Feagin JE, Bradley PJ, Parsons M.** A thioredoxin family protein of the apicoplast periphery identifies abundant candidate transport vesicles in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryot Cell.* 2008 Sep;7(9):1518-29. Epub 2008 Jun 27.
- Dorrell RG, Smith AG.** Do red and green make brown?: perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates. *Eukaryot Cell.* 2011 Jul;10(7):856-68. Epub 2011 May 27.
- Douglas S, Zauner S, Fraunholz M, Beaton M, Penny S, Deng LT, Wu X, Reith M, Cavalier-Smith T, Maier UG.** The highly reduced genome of an enslaved algal nucleus. *Nature.* 2001 Apr 26;410(6832):1091-6.
- Durnford DG, Gray MW.** Analysis of *Euglena gracilis* plastid-targeted proteins reveals different classes of transit sequences. *Eukaryot Cell.* 2006 Dec;5(12):2079-91. Epub 2006 Sep 22.
- Felsner G, Sommer MS, Maier UG.** The physical and functional borders of transit peptide-like sequences in secondary endosymbionts. *BMC Plant Biol.* 2010 Oct 19;10:223.
- Felsner G, Sommer MS, Gruenheit N, Hempel F, Moog D, Zauner S, Martin W, Maier UG.** ERAD components in organisms with complex red plastids suggest recruitment of a preexisting protein transport pathway for the periplastid membrane. *Genome Biol Evol.* 2011;3:140-50. Epub 2010 Nov 15.
- Foth BJ, Ralph SA, Tonkin CJ, Struck NS, Fraunholz M, Roos DS, Cowman AF, McFadden GI.** Dissecting apicoplast targeting in the malaria parasite *Plasmodium falciparum*. *Science.* 2003 Jan 31;299(5607):705-8.
- Gibbs SP.** The route of entry of cytoplasmically synthesized proteins into chloroplasts of algae possessing chloroplast ER. *J Cell Sci.* 1979 Feb;35:253-66.
- Gile GH, Keeling PJ.** Nucleus-encoded periplastid-targeted EFL in chlorarachniophytes. *Mol Biol Evol.* 2008 Sep;25(9):1967-77. Epub 2008 Jul 3.

- Gilson PR, Su V, Slamovits CH, Reith ME, Keeling PJ, McFadden GI.** Complete nucleotide sequence of the chlorarachniophyte nucleomorph: nature's smallest nucleus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2006 Jun 20;103(25):9566-71. Epub 2006 Jun 7.
- Gould SB, Sommer MS, Kroth PG, Gile GH, Keeling PJ, Maier UG.** Nucleus-to-nucleus gene transfer and protein retargeting into a remnant cytoplasm of cryptophytes and diatoms. *Mol Biol Evol.* 2006 Dec;23(12):2413-22. Epub 2006 Sep 13.
- Hempel F, Bullmann L, Lau J, Zauner S, Maier UG.** ERAD-derived preprotein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Biol Evol.* 2009 Aug;26(8):1781-90. Epub 2009 Apr 17.
- Hempel F, Felsner G, Maier UG.** New mechanistic insights into pre-protein transport across the second outermost plastid membrane of diatoms. *Mol Microbiol.* 2010 May;76(3):793-801. Epub 2010 Mar 25.
- Hirakawa Y, Nagamune K, Ishida K.** Protein targeting into secondary plastids of chlorarachniophytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Aug 4;106(31):12820-5. Epub 2009 Jul 20.
- Hirakawa Y, Ishida K.** Internal plastid-targeting signal found in a RubisCO small subunit protein of a chlorarachniophyte alga. *Plant J.* 2010 Nov;64(3):402-10.
- Hopkins J, Fowler R, Krishna S, Wilson I, Mitchell G, Bannister L.** The plastid in *Plasmodium falciparum* asexual blood stages: a three-dimensional ultrastructural analysis. *Protist.* 1999 Oct;150(3):283-95.
- K. Ishida, T. Cavalier-Smith, B.R. Green.** Endomembrane structure and the chloroplast protein targeting pathway in *Heterosigma akashiwo* (Raphidophyceae, Chromista). *J. Phycol.* 2000 Dec; 36(6): 1135-44
- Jarvis P, Robinson C.** Mechanisms of protein import and routing in chloroplasts. *Curr Biol.* 2004 Dec 29;14(24):R1064-77.
- Joiner KA, Roos DS.** Secretory traffic in the eukaryotic parasite *Toxoplasma gondii*: less is more. *J Cell Biol.* 2002 May 13;157(4):557-63. Epub 2002 May 13.
- Karnataki A, Derocher AE, Coppens I, Feagin JE, Parsons M.** A membrane protease is targeted to the relict plastid of *Toxoplasma* via an internal signal sequence. *Traffic.* 2007 Nov;8(11):1543-53. Epub 2007 Sep 6.
- Keeling PJ.** Chromalveolates and the evolution of plastids by secondary endosymbiosis. *J Eukaryot Microbiol.* 2009 Jan-Feb;56(1):1-8.

- Kilian O, Kroth PG.** Identification and characterization of a new conserved motif within the presequence of proteins targeted into complex diatom plastids. *Plant J.* 2005 Jan;41(2):175-83.
- Köhler S.** Multi-membrane-bound structures of Apicomplexa: I. the architecture of the *Toxoplasma gondii* apicoplast. *Parasitol Res.* 2005 Jun;96(4):258-72. Epub 2005 May 14.
- Lang M, Apt KE, Kroth PG.** Protein transport into "complex" diatom plastids utilizes two different targeting signals. *J Biol Chem.* 1998 Nov 20;273(47):30973-8.
- Lukeš J, Leander BS, Keeling PJ.** Cascades of convergent evolution: the corresponding evolutionary histories of euglenozoans and dinoflagellates. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009 Jun 16;106 Suppl 1:9963-70. Epub 2009 Jun 15.
- Maréchal E, Cesbron-Delauw MF.** The apicoplast: a new member of the plastid family. *Trends Plant Sci.* 2001 May;6(5):200-5.
- McFadden GI.** The apicoplast. *Protoplasma.* 2011 Oct;248(4):641-50. Epub 2010 Dec 17.
- Minge MA, Shalchian-Tabrizi K, Tørresen OK, Takishita K, Probert I, Inagaki Y, Klaveness D, Jakobsen KS.** A phylogenetic mosaic plastid proteome and unusual plastid-targeting signals in the green-colored dinoflagellate *Lepidodinium chlorophorum*. *BMC Evol Biol.* 2010 Jun 21;10:191.
- Moore CE, Archibald JM.** Nucleomorph genomes. *Annu Rev Genet.* 2009;43:251-64.
- Nassoury N, Cappadocia M, Morse D.** Plastid ultrastructure defines the protein import pathway in dinoflagellates. *J Cell Sci.* 2003 Jul 15;116(Pt 14):2867-74. Epub 2003 May 27.
- Nassoury N, Morse D.** Protein targeting to the chloroplasts of photosynthetic eukaryotes: getting there is half the fun. *Biochim Biophys Acta.* 2005 Mar 22;1743(1-2):5-19.
- Patron NJ, Waller RF, Archibald JM, Keeling PJ.** Complex protein targeting to dinoflagellate plastids. *J Mol Biol.* 2005 May 13;348(4):1015-24.
- Patron NJ, Waller RF.** Transit peptide diversity and divergence: A global analysis of plastid targeting signals. *Bioessays.* 2007 Oct;29(10):1048-58.
- Ralph SA, Foth BJ, Hall N, McFadden GI.** Evolutionary pressures on apicoplast transit peptides. *Mol Biol Evol.* 2004 Dec;21(12):2183-94. Epub 2004 Aug 18.
- Rapoport TA.** Protein transport across the endoplasmic reticulum membrane. *FEBS J.* 2008 Sep;275(18):4471-8. Epub 2008 Jul 26.

**Rice DW, Palmer JD.** An exceptional horizontal gene transfer in plastids: gene replacement by a distant bacterial paralog and evidence that haptophyte and cryptophyte plastids are sisters. *BMC Biol.* 2006 Sep 6;4:31.

**Riisberg I, Orr RJ, Kluge R, Shalchian-Tabrizi K, Bowers HA, Patil V, Edvardsen B, Jakobsen KS.** Seven gene phylogeny of heterokonts. *Protist.* 2009 May;160(2):191-204. Epub 2009 Feb 12.

**Rogers MB, Gilson PR, Su V, McFadden GI, Keeling PJ.** The complete chloroplast genome of the chlorarachniophyte *Bigelowiella natans*: evidence for independent origins of chlorarachniophyte and euglenid secondary endosymbionts. *Mol Biol Evol.* 2007 Jan;24(1):54-62. Epub 2006 Sep 21.

**Schleiff E, Becker T.** Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2011 Jan;12(1):48-59. Epub 2010 Dec 8.

**Schwartzbach SD, Osafune T, Löffelhardt W.** Protein import into cyanelles and complex chloroplasts. *Plant Mol Biol.* 1998 Sep;38(1-2):247-63.

**Sláviková S, Vacula R, Fang Z, Ehara T, Osafune T, Schwartzbach SD.** Homologous and heterologous reconstitution of Golgi to chloroplast transport and protein import into the complex chloroplasts of *Euglena*. *J Cell Sci.* 2005 Apr 15;118(Pt 8):1651-61. Epub 2005 Mar 29.

**Sommer MS, Gould SB, Lehmann P, Gruber A, Przyborski JM, Maier UG.** Der1-mediated preprotein import into the periplastid compartment of chromalveolates? *Mol Biol Evol.* 2007 Apr;24(4):918-28. Epub 2007 Jan 22.

**Spork S, Hiss JA, Mandel K, Sommer M, Kooij TW, Chu T, Schneider G, Maier UG, Przyborski JM.** An unusual ERAD-like complex is targeted to the apicoplast of *Plasmodium falciparum*. *Eukaryot Cell.* 2009 Aug;8(8):1134-45. Epub 2009 Jun 5.

**Stengel A, Benz JP, Buchanan BB, Soll J, Bölter B.** Preprotein import into chloroplasts via the Toc and Tic complexes is regulated by redox signals in *Pisum sativum*. *Mol Plant.* 2009 Nov;2(6):1181-97. Epub 2009 Jul 6.

**Sulli C, Fang Z, Muchhal U, Schwartzbach SD.** Topology of *Euglena* chloroplast protein precursors within endoplasmic reticulum to Golgi to chloroplast transport vesicles. *J Biol Chem.* 1999 Jan 1;274(1):457-63.

**Tonkin CJ, Kalanon M, McFadden GI.** Protein targeting to the malaria parasite plastid. *Traffic.* 2008 Feb;9(2):166-75. Epub 2007 Nov 13.

**Turmel M, Gagnon MC, O'Kelly CJ, Otis C, Lemieux C.** The chloroplast genomes of the green algae *Pyramimonas*, *Monomastix*, and *Pycnococcus* shed new light on the evolutionary history of

prasinophytes and the origin of the secondary chloroplasts of euglenids. *Mol Biol Evol.* 2009 Mar;26(3):631-48. Epub 2008 Dec 12.

**van Dooren GG, Schwartzbach SD, Osafune T, McFadden GI.** Translocation of proteins across the multiple membranes of complex plastids. *Biochim Biophys Acta.* 2001 Dec 12;1541(1-2):34-53.

**van Dooren GG, Tomova C, Agrawal S, Humbel BM, Striepen B.** *Toxoplasma gondii* Tic20 is essential for apicoplast protein import. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Sep 9;105(36):13574-9. Epub 2008 Aug 29.

**Waller RF, McFadden GI.** The apicoplast: a review of the derived plastid of apicomplexan parasites. *Curr Issues Mol Biol.* 2005 Jan;7(1):57-79.

**Wastl J, Maier UG.** Transport of proteins into cryptomonads complex plastids. *J Biol Chem.* 2000 Jul 28;275(30):23194-8.

**Yamaguchi A, Yubuki N, Leander BS.** Morphostasis in a novel eukaryote illuminates the evolutionary transition from phagotrophy to phototrophy: description of *Rapaza viridis* n. gen. et sp. (Euglenozoa, Euglenida). *BMC Evol Biol.* 2012 Mar 8;12:29.

**Yoon HS, Nakayama T, Reyes-Prieto A, Andersen RA, Boo SM, Ishida K, Bhattacharya D.** A single origin of the photosynthetic organelle in different *Paulinella* lineages. *BMC Evol Biol.* 2009 May 13;9:98.