

ROŚLINNE BIAŁKA DYNAMINO-PODOBNE – WGLĄD W EWOLUCJĘ MASZYNERII PODZIAŁU MITOCHONDRIÓW I PLASTYDÓW

PLANT DYNAMIN-LIKE PROTEINS – INSIGHTS INTO THE EVOLUTION OF DIVISION MACHINERY OF MITOCHONDRIA AND PLASTIDS

Jolanta WIEJAK, Agnieszka CHOŁUJ, Elżbieta WYROBA

Zakład Biologii Komórki, Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN

Streszczenie: Dynamina i białka dynamino-podobne (DRP) uczestniczą w wielu procesach istotnych dla prawidłowego funkcjonowania komórki oraz całego organizmu. Występują zarówno u zwierząt, jak i u roślin. U *Arabidopsis thaliana* zidentyfikowano już 16 białek dynamino-podobnych, które podzielono na 6 podrodzin. Białka DRP1 oraz ich homolog fragmoplastyna z soi biorą udział w tworzeniu przegrody pierwotnej podczas cytokinezy. Dwa białka z podrodziny DRP2 wykazują budowę domenową podobną do klasycznych dynamin ssaków i uczestniczą w procesie endocytozy, gdzie związane są z pęcherzykami opłaszczonymi klatryną. Ponadto u *Arabidopsis* i krasnorostu *Cyanidioschyzon merolae* zidentyfikowano białka dynamino-podobne, które stanowią elementy maszynerii podziału mitochondriów i chloroplastów. Organelle te, które powstały w wyniku endosymbiozy wolnożyjących *Prokaryota*, początkowo dzieliły się w bardzo podobny sposób oparty na pierścieniach FtsZ pochodzenia prokariotycznego, PD/MD – pochodzenia eukariotycznego oraz pierścieniu dynaminowym. W toku ewolucji maszyneria ta została zachowana tylko w chloroplastach oraz w mitochondriach niższych organizmów eukariotycznych, do których należy między innymi *C. merolae*. Natomiast u zwierząt, roślin i grzybów elementy mitochondrialnej maszynerii podziałowej pochodzenia prokariotycznego (FtsZ) zostały utracone i zastąpione przez białka dynamino-podobne.

Słowa kluczowe: dynamina, białka dynamino-podobne, *Arabidopsis*, mitochondria, chloroplasty, podział organelli, filogeneza.

Summary: Dynamin and dynamin-related proteins (DRP) participate in many processes essential for normal function of the cells and organisms. They were found both in animals and plants. In *Arabidopsis thaliana* 16 different dynamin-related proteins were identified that are grouped into six subfamilies. DRP1 and soybean fragmoplastin participate in the cell plate formation during cytokinesis. Two members of DRP2 subfamily display domain structure similar to mammalian classical dynamins and may be involved in endocytosis and membrane recycling via clathrin-coated vesicles. Dynamin-related proteins that are elements of mitochondrial and chloroplast division machinery were identified in *Arabi-*

dopsis and red algae *Cyanidioschyzon merolae*. These organelles that are remnants of free-living endosymbiotic prokaryotes initially divided by similar mechanisms based on FtsZ ring of prokaryotic origin, PD/MD – of eukaryotic origin and dynamin ring. In the course of evolution this system was preserved only in chloroplasts and in mitochondria of lower eukaryotes like *C. merolae*. However, in mitochondria of animals, green plants and fungi the elements of prokaryotic mitochondrial machinery (FtsZ) were replaced by dynamin-like GTPases.

Key words: dynamin, dynamin-related proteins, *Arabidopsis*, mitochondria, chloroplasts, organelles division, phylogenesis.

WSTĘP

Dynamina należy do nadrodziny dużych GTP-az, która obejmuje już kilkudziesięciu przedstawicieli zarówno w świecie zwierząt, jak i roślin. Klasyczna cząsteczka dynaminy składa się z pięciu domen: N-końcowej GTP-azowej, środkowej, plekstrynowej (PH), efektorowej (GED) i C-końcowej domeny bogatej w prolinę i argininę (PRD) [36]. Zwierzęca dynamina została po raz pierwszy wyizolowana z ekstraktów mózgu wołu jako białko związane z mikrotubulami w 1989 roku [27], zaś w roku 1995 wykryto białko dynamino-podobne także u roślin [3,6].

Pierwszymi zidentyfikowanymi roślinnymi białkami dynamino-podobnymi (ang. *dynamamin-related proteins*) były fragmoplastyna z soi [6] i jej homolog ADL1 (ang. *Arabidopsis dynamamin-like*) z *Arabidopsis thaliana* [3]. Do tej pory u *Arabidopsis* wykryto już 16 białek dynamino-podobnych, które podzielono na 6 podrodzin na podstawie ich filogenezy oraz obecności funkcjonalnych motywów. Podział ten został potwierdzony przez ich lokalizację wewnątrzkomórkową oraz różnice funkcjonalne pomiędzy poszczególnymi przedstawicielami tej rodziny [8].

Białka dynamino-podobne u *Arabidopsis* uczestniczą między innymi w tworzeniu przegrody pierwotnej (DRP1), endocytozie (DRP2) oraz podziale mitochondriów (DRP3) i chloroplastów (DRP5). Zidentyfikowano również 4 białka (DRP4A-D) podobne do zwierzęcych białek Mx o aktywności antywirusowej. Wszystkie 4 geny je kodujące zlokalizowane są kolejno w tej samej orientacji na chromosomie 1. DRP4A, B i D wydają się być pseudogenami, które pojawiły się najpóźniej w ewolucji i nie spełniają jeszcze żadnej funkcji. Natomiast DRP4C ulega transkrypcji, ale jego funkcja nie została jeszcze ustalona. O białku z podrodziny DRP6 wiadomo jedynie, że koduje polipeptyd o długości 251 aminokwasów, który jest znacznie mniejszy niż inne białka DRP. Nie wiadomo jednak, czy gen *DRP6* ulega transkrypcji oraz czy kodowane przez niego białko jest GTP-azą [9].

ROLA FRAGMOPLASTYNY I JEJ HOMOLOGÓW W POWSTAWANIU PRZEGRODY PIERWOTNEJ

Fragmoplast (wrzeciono cytokinetyczne) jest to kompleks, którego głównymi składnikami są dwie grupy mikrotubul zwrócone do siebie końcami „plus” oraz mikrofilamenty aktynowe [23]. Powstaje on podczas cytokinezy w późnej anafazie i

jest odpowiedzialny za lokalizację oraz fuzję pęcherzyków podczas powstawania przegrody pierwotnej [23]. Przegroda pierwotna zaczyna się tworzyć w centrum fragmoplastu i rozszerza się na zewnątrz dzięki ciągłej fuzji pęcherzyków powstających w aparacie Golgiego i transportowanych wzdłuż mikrotubul fragmoplastu [32].

W tworzeniu przegrody pierwotnej istotną rolę odgrywa fragmoplastyna. Jest to duża GTP-aza o masie 68 kDa, która nie zawiera dwóch domen obecnych w klasycznych dynaminach: domeny plekstrynowej (PH) oraz C-końcowej domeny bogatej w prolinę i argininę (PRD) [38].

Aktywność GTP-azowa fragmoplastyny jest wymagana do skutecznego odpąszczania i transportu pęcherzyków zawierających materiał z aparatu Golgiego do powstającej przegrody pierwotnej [38]. Fragmoplastyna wykazuje zdolność do tworzenia spiralnie zwiniętych struktur, co sugeruje, że może owijać się wokół pęcherzyków opłaszczonych klatryną i zaciskać je w struktury pęcherzykowo-tubularne (ang. *vesicle-tubule-vesicle*) [32, 38]. Fragmoplastyna początkowo znajduje się w centrum przegrody pierwotnej, a następnie przemieszcza się ku jej rosnącym krawędziom [7]. Nazywana jest markerem fragmoplastu i początkowego etapu powstawania przegrody pierwotnej [32].

U *Arabidopsis* zidentyfikowano 5 białek (DRP1A-E) homologicznych do fragmoplastyny. Wykazano, że DRP1A (ADL1, ADL1A), C (ADL1C) i E (ADL1E) są związane z mikrotubulami i lokalizują się w powstającej przegrodzie pierwotnej podczas cytokinezy [9, 11, 12] oraz mogą odgrywać rolę w tworzeniu i stabilizacji błony komórkowej [11] i w cytoskiecie [9].

W roku 2003 w doświadczeniach przeprowadzonych z użyciem białka fuzyjnego GFP-DRP1 zbadano rozmieszczenie białek DRP1A, C i E podczas cyklu komórkowego [9]. Białko DRP1A w fazie G1 związane jest wyłącznie z mikrotubulami korykalnymi. W fazie S jądro przemieszcza się do centrum komórki, zaś DRP1A nadal rozmieszczone jest w postaci nitkowatych struktur biegnących od regionu perinuklearnego w kierunku korteksu. W komórkach metafazowych DRP1A związane jest z wrzecionem mitotycznym, natomiast podczas późnej anafazy znajduje się w rejonie mikrotubul fragmoplastu i w powstającej przegrodzie pierwotnej. Pęcherzyki zawierające DRP1A mogą łączyć się ze sobą i tworzyć struktury tubularne w regionie fragmoplastu jeszcze przed osiągnięciem przegrody pierwotnej [9]. DRP1A i fragmoplastyna lokalizują się w podobny sposób w powstającej przegrodzie pierwotnej [6, 7, 12].

Białko DRP1C w komórkach mitotycznych jest także związane z mikrotubulami wrzeciona, ale nie tak silnie jak DRP1A, oraz jest rozmieszczone punktowo w całej komórce. Podczas cytokinezy przemieszcza się do powstającej przegrody pierwotnej, szczególnie do jej krawędzi [9]. Rozmieszczenie DRP1C nieco więc różni się od lokalizacji DRP1A, co sugeruje, że odgrywa ono odmienną rolę w powstawaniu przegrody pierwotnej.

DRP1E lokalizuje się w powstającej przegrodzie pierwotnej w późnych stadiach telofazy. Ulega przemieszczeniu z centralnej części przegrody do jej rosnących krawędzi. Wydaje się, że jest ono związane z siecią tubularną. Możliwe jest, że DRP1A i DRP1C są zaangażowane w tworzenie struktur tubularno-pęcherzykowych, podczas gdy DRP1E odgrywa rolę w tworzeniu sieci tubularnej. Odmienne role tych białek w procesie

tworzenia przegrody pierwotnej są zgodne z subtelnymi różnicami w ich lokalizacji podczas różnych stadiów podziału komórki [9].

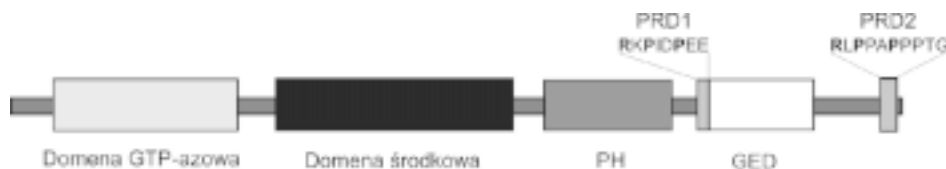
ROŚLINNE BIAŁKA DYNAMINO-PODOBNE – ROLA W ENDOCYTOZIE

Jedynymi jak dotąd zidentyfikowanymi roślinnymi białkami dynamino-podobnymi mającymi budowę domenową identyczną z klasycznymi dynaminami ssaków są dwa białka z podrodziny DRP2 wykryte u *Arabidopsis*: DRP2A (ADL6) [10, 14, 15] i DRP2B (ADL3) [17], które wykazują 92% identyczności [9]. DRP2A charakteryzuje się obecnością domeny PH oraz dwóch potencjalnych motywów prolinowych: PRD1 (RKPIDPEE) i PRD2 (RLPPAPPPTG) (ryc. 1), które zlokalizowane są w C-końcowej części białka i odpowiadają domenie PRD [14].

Domena PH jest odpowiedzialna za oddziaływanie białek z lipidami błonowymi [17]. DRP2A ma zdolność wiązania kwasu fosfatydowego (PA), fosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP), bisfosforanu fosfatydyloinozytolu (PIP₂), natomiast nie wiąże fosfatydyloseryny i fosfatydyloglicerolu. Aktywność GTP-azowa DRP2A jest stymulowana przede wszystkim przez PA, który jest istotnym wtórnym przekaźnikiem informacji w komórkach roślinnych, w przeciwieństwie do dynamin zwierzęcych, których aktywność jest stymulowana głównie przez fosfoinozytole [14, 15].

U *Arabidopsis* zidentyfikowano rodzinę białek zawierających domenę SH3 (ang. *Src homology 3*) – AtSH3P [14]. Stwierdzono, że tylko AtSH3P3 (białko strukturalnie podobne do zwierzęcej amfifizyny i endofiliny) oddziałuje z domeną PRD1, ale nie z PRD2 białka DRP2A. Wydaje się, że AtSH3P3 może być zaangażowane w wyselekcjonowanie DRP2A do kompleksu białek pomocniczych. Nie znaleziono jak dotąd białka z domeną SH3, które mogłoby oddziaływać z drugim motywem prolinowym. Być może jest to α -adaptyna – składnik kompleksu adaptorowego pęcherzyków opłaszczonych klatryną w TGN, ponieważ C-terminalny koniec DRP2A oddziałuje z tym białkiem [14].

DRP2A jest obecne w postaci punktowych struktur w cytoplazmie, prawdopodobnie w aparacie Golgiego, gdzie może być istotne w dostarczaniu materiału do wakuoli [10]. Podczas cytokinezy kierowane jest do powstającej przegrody pierwotnej, natomiast tylko w niewielkiej ilości występuje w obrębie mikrotubul fragmoplastu. Może być również zaangażowane w recykling z błony komórkowej i przegrody pierwotnej w drodze endocytozy [8], gdyż



RYCINA 1. Budowa domenowa białka DRP2 (wg [14], zmodyfikowane): PH – domena plekstrynowa, GED – GTP-azowa domena efektorowa, PRD1 i PRD2 – motywy prolinowe

wykazano, że jest związane z pęcherzykami opłaszczonymi klatryną [14]. Wydaje się, że białka DRP2 mogą odgrywać istotną rolę w transporcie pęcherzyków opłaszczonych klatryną pomiędzy aparatem Golgiego, błoną komórkową, przegrodą pierwotną i wakuolami.

MASZYNERIA PODZIAŁU MITOCHONDRIÓW I CHLOROPLASTÓW

Mitochondria i chloroplasty pochodzą od wolnożyjących *Prokaryota*, które w toku ewolucji utraciły swoją autonomię i stały się organizmami endosymbiotycznymi.

U większości *Prokaryota* główną rolę w podziale komórkowym odgrywa GTP-aza FtsZ [2, 24]. Jest to zlokalizowane w cytoplazmie białko cytoszkieletowe, które wykazuje strukturalne i biochemiczne podobieństwo do eukariotycznej tubuliny. FtsZ hydrolizuje GTP i ulega oligomeryzacji tworząc pierścień w centralnej części komórki na wewnętrznej powierzchni błony cytoplazmatycznej, który zaciska się podczas cytokinezy bakterii. Pierścień FtsZ prawdopodobnie służy jako rusztowanie, do którego przyłączają się inne białka komórkowej maszynerii podziałowej oraz może również generować siłę niezbędną do zaciśnięcia błony [24].

Mechanizm podziału mitochondriów i chloroplastów u niższych eukariota był bardzo podobny i opierał się na pierścieniach FtsZ, PD/MD (ang. *plastid-/mitochondrial-dividing ring*) oraz pierścieniu dynaminowym. Podczas ewolucji system ten został w zasadzie zachowany w chloroplastach, podczas gdy w mitochondriach zwierząt, roślin i grzybów pierścień FtsZ został utracony, pierścień MD również lub bardzo uproszczony, natomiast ich funkcje przejęły białka dynamino-podobne [2, 4, 25]. Obecność struktur pierścieńowych (MD) zaobserwowano jednak w mitochondriach współczesnych krasnorostów *Cyanidioschyzon merolae* oraz *Cyanidium* [18] oraz w dzielących się mitochondriach śluzowca *Physarum polycephalum* [19].

Rola GTP-azy FtsZ i białek dynamino-podobnych w podziale mitochondriów i chloroplastów jest odmienna. FtsZ działa na wczesnym etapie podziału, gdzie prawdopodobnie wyznacza miejsce podziału, natomiast białka DRP są wymagane później, gdy organelle są już częściowo zaciśnięte i pozostaje tam aż do ukończenia podziału. Ponadto oba białka wiążą się z innymi błonami: FtsZ z błoną wewnętrzną, natomiast DRP – z zewnętrzną [24]. Z drugiej strony, mechanizm działania obu białek jest bardzo podobny: mają zdolność do oligomeryzacji oraz tworzenia pierścieni i spiral, a energia niezbędna do tego procesu pochodzi z hydrolizy GTP [16].

Pochodzenie białek dynamino-podobnych biorących udział w podziale mitochondriów i chloroplastów wciąż pozostaje niejasne. Pewne wskazówki dała badaczom analiza zsekwencjonowanego genomu pierwotniaka *Giardia intestinalis*. *Giardia* wtórnie utraciła mitochondrium, ale ma pojedynczy gen kodujący białko dynamino-podobne zlokalizowane w obrębie wewnątrzkomórkowych struktur pęcherzykowych w przeciwieństwie do innych niższych organizmów eukariotycznych, które mają mitochondrialne białka DRP [24]. Natomiast w genomie pasożyta *Trypanosoma* istnieje pojedynczy

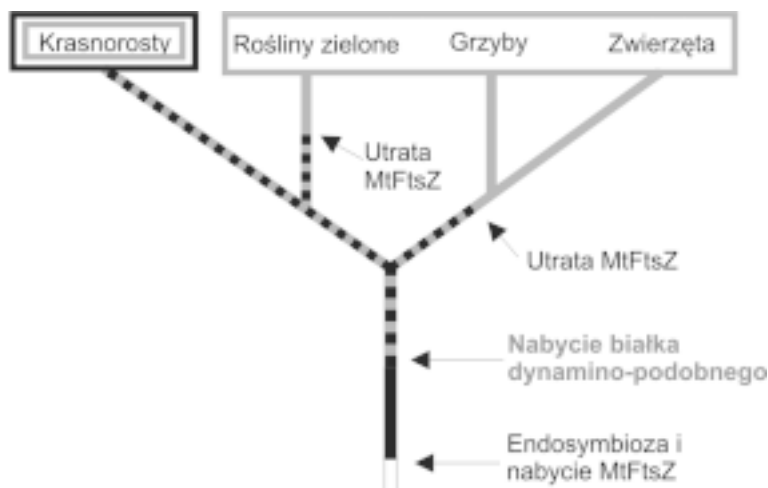
gen kodujący białko dynamino-podobne biorące udział w podziale mitochondriów [20]. Wydaje się więc, że przodek organizmów eukariotycznych miał pojedyncze białko DRP, z którego, w wyniku duplikacji genów, powstały rodziny białek DRP biorące udział w podziale organelli i innych procesach w komórce [24].

Białka dynamino-podobne mają swoje strukturalne i ewolucyjne odpowiedniki w organizmach prokariotycznych, z których być może wyewoluowały [24]. Z drugiej strony, endosymbiotyczne bakterie mogły wykorzystać endocytotyczny szlak zależny od dynaminy do wniknięcia przez błonę komórkową gospodarza, a następnie zaczęły używać dynaminy również do podziału [18]. Obserwacje te wskazują na istotną rolę białek dynamino-podobnych w ewolucji organizmów eukariotycznych.

U glonów najlepiej poznano i opisano mechanizm podziału mitochondriów i chloroplastów u krasnorosta *Cyanidioschyzon merolae*. *C. merolae* ma jedno mitochondrium i jeden chloroplast, które dzielą się synchronicznie podczas cykli jasnego i ciemnego. W miejscach podziału mitochondriów i chloroplastów zlokalizowano struktury w kształcie pierścieni: MD i PD. Zidentyfikowano również dwa białka dynamino-podobne: CmDnm1 biorące udział w podziale mitochondriów [22] i CmDnm2 biorące udział w podziale chloroplastów [19].

ROLA ROŚLINNYCH BIAŁEK DYNAMINO-PODOBNYCH W PODZIALE MITOCHONDRIÓW

Mechanizm podziału mitochondriów zmieniał się w toku ewolucji. Jego hipotetyczny przebieg przedstawiony jest na rycinie 2. Pierwsze organizmy eukariotyczne używały wyłącznie prokariotycznego aparatu podziałowego, którego głównym elementem było



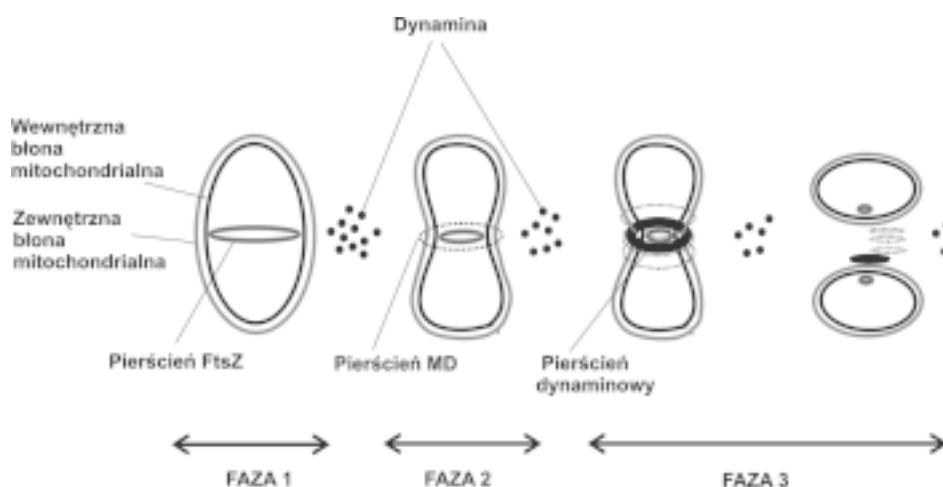
RYCINA 2. Pochodzenie mechanizmu podziałowego mitochondriów (wg [2], zmodyfikowane). Kolorem czarnym zaznaczono występowanie białka FtsZ pochodzenia prokariotycznego, natomiast szarym – białka dynamino-podobnego pochodzenia eukariotycznego

białko MtFtsZ (ang. *mitochondrial FtsZ*). Nabycie aparatu podziału mitochondriów opartego na białkach dynamino-podobnych nastąpiło bardzo wcześnie w ewolucji [31], prawdopodobnie jeszcze przed rozdzieleniem się linii ewolucyjnej zwierząt, grzybów i roślin, co może wskazywać na istnienie ich wspólnego przodka. Potwierdza to wysoki stopień podobieństwa funkcji i sekwencji białek Drp1 z *Caenorhabditis elegans*, Dnm1 z drożdży oraz dwóch białek z podrodziny DRP3 z *Arabidopsis* [2]. Poza tym inne białka biorące udział w podziale mitochondriów u zwierząt, grzybów i roślin (np. Fis1/Mdv2) są także podobne [21].

Mechanizm podziału mitochondriów u współcześnie żyjących wyższych organizmów eukariotycznych opiera się wyłącznie na białkach dynamino-podobnych. Wydaje się, że utrata MtFtsZ mogła nastąpić niezależnie w linii ewolucyjnej zwierząt i grzybów oraz roślin wyższych. Brak tego białka u wyższych organizmów eukariotycznych może wynikać z faktu, że ich mitochondria w toku ewolucji stały się bardziej dynamiczne i heterogenne i być może wykształciły niezależne mechanizmy inicjacji podziału. FtsZ mogło zostać zastąpione przez inne białka wewnątrz komórki, odpowiadające mu funkcjonalnie. Z drugiej jednak strony, wszystkie zidentyfikowane do tej pory białka dynamino-podobne biorące udział w podziale mitochondriów są związane z zewnętrzną błoną mitochondrialną, co sugeruje, że proces ten nie wymaga obecności białek związanych z wewnętrzną błoną. U mutantów drożdży niemających funkcjonalnego białka DRP siła powstająca podczas cytokinezy jest wystarczająca do podziału mitochondriów. U *C. elegans* natomiast stwierdzono, że podział wewnętrznej błony mitochondrialnej zachodzi niezależnie od podziału błony zewnętrznej. Jeśli więc istnieje mechanizm regulujący dynamikę błony wewnętrznej, to prawdopodobnie uczestniczy on raczej w tworzeniu i regulacji wewnątrzmitochondrialnych struktur błonowych niż w samym podziale mitochondriów [24].

Współcześnie istnieją organizmy eukariotyczne, które używają obu aparatów podziału mitochondriów. Należy do nich między innymi krasnorost *C. merolae*, który ma wewnętrzny pierścień FtsZ pochodzenia proteobakteryjnego oraz pierścień zewnętrzny, którego składnikiem jest prawdopodobnie białko dynamino-podobne CmDnm1 [22]. Białka podobne do FtsZ występują także u *Dictyostelium discoideum* [5]. *Dictyostelium* ma ponadto dwa białka dynamino-podobne, z których jedno wykazuje podobieństwo do Dnm1 oraz CmDnm1, niewyjaśniona jest jednak jego rola w podziale mitochondriów [37].

W pierwszej fazie podziału mitochondriów u *C. merolae* (ryc. 3) na wewnętrznej błonie mitochondrialnej po stronie matriks powstaje rusztowanie utworzone przez pierścień FtsZ. Pierścień ten wyznacza miejsce podziału. Następnie po cytoplazmatycznej stronie mitochondrium powstaje pierścień MD, który zaczyna się zaciskać. W ostatniej fazie tuż przed ostatecznym podziałem mitochondrium do wnętrza zaciskającego się pierścienia MD oraz do cytoplazmatycznej powierzchni zewnętrznej błony rekrutowane jest białko dynamino-podobne CmDnm1. Pierścień dynaminowy jest wymagany tylko na ostatnim etapie podziału mitochondriów, po tym jak pierścienie FtsZ i MD zostaną zaciśnięte. Każdy z tych pierścieni spełnia odmienną funkcję, jest inaczej zlokalizowany i działa w innej fazie podziału [22].



RYCINA 3. Schemat podziału mitochondriów u krasnorostu *C. merolae* (wg [22], zmodyfikowane). W fazie 1 na wewnętrznej błonie po stronie matriks powstaje pierścień FtsZ, który wyznacza miejsce podziału. Następnie (faza 2) po stronie cytoplazmatycznej powstaje pierścień MD, który zaczyna się zaciskać. W fazie 3 tuż przed ostatecznym podziałem mitochondrium do wnętrza zaciskającego się pierścienia MD po cytoplazmatycznej stronie zewnętrznej błony przyłączane jest białko dynamino-podobne CmDnm1

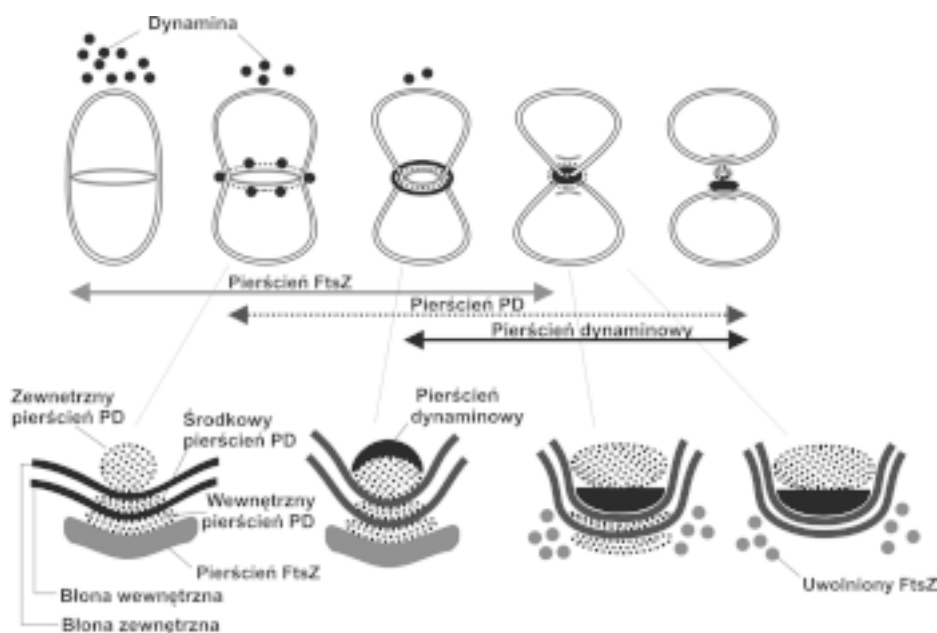
Wydaje się więc, że bakteryjny typ aparatu podziałowego, którego głównym elementem była GTP-aza FtsZ, został przynajmniej częściowo zachowany w przypadku mitochondriów glonów. Genów kodujących tego typu białka nie znaleziono natomiast ani w genomie *C. elegans*, ani u drożdży. U tych organizmów w podziale mitochondriów bierze udział białko dynamino-podobne Drp1/Dnm1 zlokalizowane na zewnętrznej błonie mitochondrialnej w postaci punktowych struktur w miejscach zaciskania i podziału mitochondriów [13, 26]. U człowieka także istnieje homolog Drp1/Dnm1, który jest istotny w podziale mitochondriów [28]. Wydaje się, że rośliny wyższe również utraciły bakteryjny aparat podziału mitochondriów, a zastąpiły je białka dynamino-podobne. U *Arabidopsis* zidentyfikowano dwa białka: DRP3A (ADL2a) i DRP3B (ADL2b) wykazujące 76,7% identyczności na poziomie sekwencji aminokwasowej [1, 2]. Stwierdzono, że białko ADL2b formuje pierścienie na zewnętrznej stronie mitochondriów podczas ich podziału. Występuje w miejscach, gdzie mitochondria są zaciskane przed podziałem, a po podziale pozostaje na końcach mitochondriów [2]. Drugie białko z tej podrodziny ADL2a wykazuje podobną lokalizację wewnątrzkomórkową jak ADL2b i również uczestniczy w podziale mitochondriów [1].

ROLA BIAŁEK DYNAMINO-PODOBNYCH W PODZIALE CHLOROPLASTÓW

Chloroplasty dzielą się w bardzo podobny sposób jak mitochondria, jednak nie są to procesy równoważne. Podział chloroplastów może być rozumiany jako szereg kolejnych etapów, w których biorą udział różne struktury pierścieniowe o odmiennych funkcjach i pojawiające się w różnym czasie.

W toku ewolucji wiele genów wolnożyjących endosymbiotycznych cyjanobakterii, od których pochodzą chloroplasty, zostało przeniesionych do genomu jądrowego, gdzie nabyły sekwencje kodujące peptydy sygnałowe kierujące produkty tych genów z powrotem do chloroplastów [4]. U roślin zidentyfikowano pięć takich białek: FtsZ1, FtsZ2, MinD, MinE i ARTEMIS. Są one kodowane w jądrze, ale zlokalizowane w chloroplastach, gdzie uczestniczą w ich podziale. W procesie tym biorą także udział kompleksy o strukturze pierścieni PD zlokalizowane po stronie stromy wewnętrznej błony chloroplastu oraz na powierzchni cytoplazmatycznej błony zewnętrznej. W obrębie pierścienia podziałowego chloroplastów zostało zlokalizowane białko DRP5B (ARC5) u *Arabidopsis* [4] oraz jego ortolog CmDnm2 u *C. merolae* [19]. Białko ARC5 występuje na powierzchni zewnętrznej błony i tworzy pierścień na późnym etapie podziału chloroplastów. Nie ma homologów u cyjanobakterii i wydaje się, że jest pochodzenia eukariotycznego [4].

Podczas podziału chloroplastów u *C. merolae* (ryc. 4) jako pierwszy powstaje pierścień FtsZ wewnątrz chloroplastu, a następnie tworzą się pierścienie podziałowe PD, których składniki pozostają nieznane. Pierścień FtsZ znajduje się po stronie stromy wewnętrznego pierścienia PD [19]. Pierścień podziałowy (PD) składa się z 3 pierścieni: głównego, zewnętrznego po stronie cytoplazmatycznej zewnętrznej błony chloroplastów, wewnętrznego na błonie plastydowej po stronie stromy oraz środkowego w przestrzeni międzybłonowej. Podczas późnego etapu zaciskania po stronie cytoplazmatycznej



RYCINA 4. Podział chloroplastów u *C. merolae* (wg [19], zmodyfikowane). Najpierw pojawia się pierścień FtsZ wewnątrz chloroplastu. Następnie tworzy się pierścień podziałowy (PD) złożony z 3 pierścieni: zewnętrznego stanowiącego główną siłę zaciskającą, wewnętrznego oraz środkowego. Pierścień dynaminowy (utworzony przez białko CmDnm2) powstaje podczas późnego etapu podziału i przemieszcza się do przestrzeni pomiędzy zewnętrznym PD a zewnętrzną błoną chloroplastu. Na ostatnim etapie podziału pierścienie FtsZ oraz środkowy i wewnętrzny PD rozpadają się

zewnątrznego pierścienia PD powstaje pierścień dynaminowy utworzony przez białko CmDnm2, który następnie przemieszcza się do przestrzeni pomiędzy zewnętrznym pierścieniem PD a zewnętrzną błoną chloroplastu. Podczas tego etapu dochodzi również do rozpadu pierścienia FtsZ, a białko FtsZ jest przesuwane z miejsca podziału w kierunku dwóch przyszłych siostrzanych chloroplastów. Tuż przed ukończeniem podziału zanika środkowy i wewnętrzny pierścień PD. Pierścień zewnętrzny pozostaje pomiędzy siostrzanymi chloroplastami, natomiast pozostałości po pierścieniu dynaminowym przyczepiają się do każdego z nich. Z wszystkich 5 pierścieni tylko zewnętrzny pierścień PD istnieje podczas całego procesu zaciskania, które rozpoczyna się tuż po jego utworzeniu. Wydaje się, że to właśnie zewnętrzny pierścień PD najprawdopodobniej jest związany z powstaniem siły zaciskającej na wczesnym etapie podziału chloroplastu [18, 19].

Wykrycie białek dynamino-podobnych: ARC5 u *Arabidopsis* i jego homologu u *C. merolae*, które są zlokalizowane na zewnętrznej błonie chloroplastów i biorą udział w późnych etapach podziału, podobnie jak mitochondrialne białka dynamino-podobne, wskazuje, że mechanizm podziałowy chloroplastów jest częściowo pochodzenia prokariotycznego, a częściowo eukariotycznego oraz świadczy o wzajemnej ewolucyjnej korelacji pomiędzy podziałem chloroplastów i mitochondriów.

PODSUMOWANIE

Z punktu widzenia ewolucyjnego dynaminy i białka dynamino-podobne pojawiły się jako elementy mechanizmu podziału mitochondriów i chloroplastów, a dopiero później przejęły funkcje endocytotyczne. Taką właśnie rolę pełni jedyne białko dynamino-podobne u *Trypanosoma*, które nie jest wymagane do procesu endocytozy [20], jak to jest w przypadku organizmów wyższych. Jak do tej pory najstarszą ewolucyjnie komórką, w której dynamina uczestniczy w procesach endocytotycznych, jest *Paramecium* [33, 35], u którego stwierdziliśmy obecność dwóch genów kodujących to białko [34]. *Paramecium* jako orzęsek wyewoluowało około 1,5 mld lat temu [29], a więc znacznie później niż Kinetoplastida [30], do których należy *Trypanosoma*, oraz jeszcze przed wyodrębnieniem się linii ewolucyjnej roślin i zwierząt.

LITERATURA

- [1] ARIMURA S, AIDA GP, FUJIMOTO M, NAKAZONO M, TSUTSUMI N. *Arabidopsis* dynamin-like protein 2a (ADL2a), like ADL2b, is involved in plant mitochondrial division. *Plant Cell Physiol* 2004; **45**: 236–242.
- [2] RIMURA S, TSUTSUMI N. A dynamin-like protein (ADL2b), rather than FtsZ, is involved in *Arabidopsis* mitochondrial division. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; **99**: 5727–5731.
- [3] DOMBROWSKI JE, RAIKHEL NV. Isolation of a cDNA encoding a novel GTP-binding protein of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 1995; **28**: 1121–1126.
- [4] GAO H, KADIRIAN-KALBACH D, FROELICH JE, OSTERYOUNG KW. ARC5, a cytosolic dynamin-like protein from plants, is part of the chloroplast division machinery. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 4328–4333.

- [5] GILSON PR, YU XC, HERELD D, BARTH C, SAVAGE A, KIEFEL BR, LAY S, FISHER PR, MARGOLIN W, BEECH PL. Two *Dictyostelium* orthologs of the prokaryotic cell division protein FtsZ localize to mitochondria and are required for the maintenance of normal mitochondrial morphology. *Eukaryot Cell* 2003; **2**: 1315–1326.
- [6] GU X, VERMA DPS. Phragmoplastin, a dynamin like protein associated with cell plate formation in plants. *EMBO J* 1996; **15**: 695–709.
- [7] GU X, VERMA DPS. Dynamics of phragmoplastin in living cells during cell plate formation and uncoupling of cell elongation from the plane of cell division. *Plant Cell* 1997; **9**: 157–169.
- [8] HONG Z, BEDNAREK SY, BLUMWALD E, HWANG I, JURGENS G, MENZEL D, OSTERYOUNG KW, RAIKHEL NV, SHINOZAKI K, TSUTSUMI N, VERMA DP. A unified nomenclature for *Arabidopsis* dynamin-related large GTPases based on homology and possible functions. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 261–265.
- [9] HONG Z, GEISLER-LEE CJ, ZHANG Z, VERMA DP. Phragmoplastin dynamics: multiple forms, microtubule association and their roles in cell plate formation in plants. *Plant Mol Biol* 2003; **53**: 297–312.
- [10] JIN JB, KIM YA, KIM SJ, LEE SH, KIM DH, CHEONG GW, HWANG I. A new dynamin-like protein, ADL6, is involved in trafficking from the trans-Golgi network to the central vacuole in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 2001; **13**: 1511–1526.
- [11] KANG BH, BUSSE JS, BEDNAREK SY. Members of the *Arabidopsis* dynamin-like gene family, ADL1, are essential for plant cytokinesis and polarized cell growth. *Plant Cell* 2003; **15**: 899–913.
- [12] KANG BH, BUSSE JS, DICKEY C, RANCOUR DM, BEDNAREK SY. The *Arabidopsis* cell plate-associated dynamin-like protein, ADL1Ap, is required for multiple stages of plant growth and development. *Plant Physiol* 2001; **126**: 47–68.
- [13] LABROUSSE AM, ZAPPATERRA MD, RUBE DA, VAN DER BLIEK AM. *C. elegans* dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 1999; **4**: 815–826.
- [14] LAM BC, SAGE TL, BIANCHI PL, BLUMWALD E. Regulation of ADL6 activity by its associated molecular network. *Plant J* 2002; **31**: 565–576.
- [15] LEE SH, JIN JB, SONG J, MIN MK, PARK DS, KIM YW, HWANG I. The intermolecular interaction between the PH domain and the C-terminal domain of *Arabidopsis* dynamin-like 6 determines lipid binding specificity. *J Biol Chem* 2002; **277**: 31842–31849.
- [16] MARGOLIN W. Organelle division: Self-assembling GTPase caught in the middle. *Curr Biol* 2000; **10**: R328–R330.
- [17] MIKAMI K, IUCHI S, YAMAGUSHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. A novel *Arabidopsis thaliana* dynamin-like protein containing the pleckstrin homology domain. *J Exp Bot* 2000; **51**: 317–318.
- [18] MIYAGISHIMA SY, NISHIDA K, KUROIWA T. An evolutionary puzzle: chloroplast and mitochondrial division rings. *Trends Plant Sci* 2003; **8**: 432–438.
- [19] MIYAGISHIMA SY, NISHIDA K, MORI T, MATSUZAKI M, HIGASHIYAMA T, KUROIWA H, KUROIWA T. A plant-specific dynamin-related protein forms a ring at the chloroplast division site. *Plant Cell* 2003; **15**: 655–665.
- [20] MORGAN GW, GOULDING D, FIELD MC. The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J Biol Chem* 2004; **279**: 10692–10701.
- [21] MOZDY AD, MCCAFFERY JM, SHAW JM. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol* 2000; **151**: 367–379.
- [22] NISHIDA K, TAKAHARA M, MIYAGISHIMA SY, KUROIWA H, MATSUZAKI M, KUROIWA T. Dynamic recruitment of dynamin for final mitochondrial severance in a primitive red alga. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003; **100**: 2146–2151.
- [23] NISHIHAMA R, MACHIDA Y. Expansion of the phragmoplast during plant cytokinesis: a MAPK pathway may MAP it out. *Curr Opin Plant Biol* 2001; **4**: 507–512.
- [24] OSTERYOUNG KW, NUNNARI J. The division of endosymbiotic organelles. *Science* 2003; **302**: 1698–1704.
- [25] OSTERYOUNG KW, MCANDREW RS. The plastid division machine. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 315–333.
- [26] SHAW JM, NUNNARI J. Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 2002; **12**: 178–184.
- [27] SHPETNER HS, VALLE RB. Identification of dynamin, a novel mechanochemical enzyme that mediates interactions between microtubules. *Cell* 1989; **59**: 421–432.
- [28] SMIRNOVA E, GRIPARIC L, SHURLAND DL, VAN DER BLIEK AM. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 2001; **12**: 2245–2256.

- [29] SOGIN ML, ELWOOD HJ. Primary structure of the *Paramecium tetraurelia* small subunit rRNA coding region: phylogenetic relationships within the *Ciliophora*. *J Mol Evol* 1986; **23**: 53–60.
- [30] SOGIN ML, SILBERMAN JD. Evolution of the protists and protistan parasites from the perspective of molecular systematics. *Int J Parasitol* 1998; **28**: 11–20.
- [31] VAN DER BLIEK AM. A mitochondrial division apparatus takes shape. *J Cell Biol* 2000; **151**: F1–F4.
- [32] VERMA DPS. Cytokinesis and building of the cell plate in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 2001; **52**: 751–784.
- [33] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin involvement in *Paramecium* phagocytosis. *Eur J Protistol* 2003; **39**: 416–422.
- [34] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin- and clathrin-dependent endocytic pathway in unicellular eukaryote *Paramecium*. *Biochem Cell Biol* 2004; **82**: 547–558.
- [35] WIEJAK J, SURMACZ L, WYROBA E. Dynamin-association with agonist-mediated sequestration of beta-adrenergic receptor in single-cell eukaryote *Paramecium*. *J Exp Biol* 2004; **207**: 1625–1632.
- [36] WIEJAK J, WYROBA E. Struktura i funkcja dynamin oraz białek dynamino-podobnych. *Post Biochem* 2004; **50**: 240–247.
- [37] WIENKE DC, KNETSH ML, NEUHAUS EM, REEDY MC, MANSTEIN DJ. Disruption of a dynamin homologue affects endocytosis, organelle morphology, and cytokinesis in *Dictyostelium discoideum*. *Mol Biol Cell* 1999; **10**: 225–243.
- [38] ZHANG Z, HONG Z, VERMA DP. Phragmoplastin polymerizes into spiral coiled structures via intermolecular interaction of two self-assembly domains. *J Biol Chem* 2000; **275**: 8779–8784.

Redaktor prowadzący – Maria Olszewska

Otrzymano 07.03.2005 r.

Przyjęto: 14.04.2005 r.

ul. Pasteura 3, 02-093 Warszawa

e-mail: e.wyroba@nencki.gov.pl