

Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Speciální chemicko-biologické obory
Studijní obor: Molekulární biologie a biochemie organismů



Eliška Novotná

Úloha mitochondriální dynamiky v buněčné smrti

The role of mitochondrial dynamics in cell death

Bakalářská práce

Školitel: Mgr. Jakub Rohlena, Ph.D.

Praha, 2017

Poděkování:

Na tomto místě bych ráda poděkovala svému školiteli Jakobovi Rohlenovi za cenné rady a trpělivé revize mé práce. Mimo toho si velice vážím jeho schopnosti motivovat mě k práci a děkuji za jeho pomoc v mém rozvoji ve světě vědy.

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, 5. 5. 2017

Abstrakt:

Mitochondrie tvoří v buňce dynamické retikulum, které po indukci regulované buněčné smrti neboli apoptózy podléhá fragmentaci. Předpokládá se, že během iniciace vnitřní apoptotické kaskády proteiny mitochondriální dynamiky zajišťují remodelaci mitochondrií a snazší uvolňování cytochromu c do cytosolu. Důležitou roli v tomto procesu hrají především protein Opa1 zajišťující ve zdravé buňce mitochondriální fúzi a protein Drp1 zodpovědný za mitochondriální fragmentaci. Opa1 reguluje v apoptóze otevření krist vnitřní mitochondriální membrány a následné uvolnění cytochromu c. Role Drp1 je méně jasná. Drp1 se po indukci apoptózy váže na mitochondrie, čímž podporuje tvorbu apoptotických pórů a mitochondriální fragmentaci. Vazba Drp1 ale není esenciální ani pro permeabilizaci vnější mitochondriální membrány, a tedy výlev proapoptotických faktorů, ani pro fragmentaci mitochondriálního retikula v apoptóze. Je tedy otázkou, jakou přesnou funkci v tomto procesu Drp1 zastává. Mitochondriální dynamika je také ovlivněna přímo proteiny apoptotické kaskády, a to členy rodiny Bcl-2 proteinů. V apoptóze díky jejich působení dochází nejen k indukci mitochondriálního dělení, ale také k inhibici fúze, což přispívá k fragmentaci mitochondriálního retikula. Ačkoliv je fragmentace mitochondrií v apoptóze dlouho pozorovaným jevem, její účel stále není zcela zřejmý.

Klíčová slova:

Mitochondriální dynamika, apoptóza, Drp1, Opa1, Bcl-2 proteiny, remodelace krist, MOMP, cytochrom c, fragmentace mitochondrií.

Abstract:

Mitochondria form a dynamic reticulum, which fragments in apoptosis. It is assumed that proteins of mitochondrial dynamics participate in the intrinsic pathway of apoptosis and remodel mitochondrial membranes to release cytochrome c to the cytosol. The most important role in this process is played by Opa1, a protein involved in mitochondrial fusion, and by Drp1, which induces mitochondrial fission. During apoptosis, Opa1 remodels cristae in the inner mitochondrial membrane, which is crucial for effective release of cytochrome c to the cytosol. The role of Drp1 is less clear and is a subject of intense debate. Upon initiation of apoptosis Drp1 is recruited to mitochondria where it facilitates apoptotic pore formation and triggers fission. However, it appears that recruitment of Drp1 is not absolutely required for successful execution of apoptosis. In addition, mitochondrial dynamics is influenced by Bcl-2 family proteins. Recruitment of proapoptotic Bcl-2 proteins to mitochondrial outer membrane leads to inhibition of mitochondrial fusion, which enhances fragmented morphology of mitochondria. Although mitochondrial fragmentation in apoptosis is known for decades, its precise purpose remains to be elucidated.

Key words:

Mitochondrial dynamics, apoptosis, Drp1, Opa1, Bcl-2 family, cristae remodelling, MOMP, cytochrome c, mitochondrial fragmentation.

Seznam zkratek:

| | | |
|----------|--|--|
| A1 | Bcl-2 related protein A1 | Protein příbuzný Bcl-2 |
| AIF | Apoptosis inducing factor | Faktor způsobující apoptózu |
| ATP | Adenosine triphosphate | Adenosin trifosfát |
| Bad | Bcl-2 antagonist of cell death | Antagonista buněčné smrti z rodiny Bcl-2 proteinů |
| Bak | Bcl-2 antagonist killer 1 | Bcl-2 antagonista |
| Bap31 | B-cell receptor-associated protein 31 | Protein asociovaný s receptorem B lymfocytů 31 |
| Bax | Bcl-2 associated x protein | Protein x asociovaný s Bcl-2 |
| Bcl-2 | B cell lymphoma protein 2 | Protein lymfomu B lymfocytů 2 |
| Bcl-B | Bcl-2 like 10 | Protein podobný Bcl-2 10 |
| Bcl-w | Bcl-2 like 2 | Protein podobný Bcl-2 2 |
| Bcl-xL | Bcl-2 like 1 | Protein podobný Bcl-2 1 |
| BH 1-4 | Bcl-2 homology domain 1-4 | Homologická doména Bcl-2 proteinů |
| BH3-only | | Proteiny Bcl-2 rodiny obsahující pouze BH3 homologickou doménu |
| Bid | Bcl-2 interacting domain death agonist | |
| Bik | Bcl-2 interacting killer | |
| Bim | Bcl-2 interacting mediator of cell death | |
| Bmf | Bcl-2 modifying factor | |
| bNIP3 | Bcl-2 interacting protein 3 | |
| Bok | Bcl-2 related ovarian killer | |
| cDNA | Complementary DNA | Komplementární deoxyribonukleová kyselina |
| Cyt c | Cytochrome c | Cytochrom c |
| ddGFP | Dimerization dependent green fluorescent protein | Zelený fluorescenční protein závislý na dimerizaci |
| DKO | Double knockout | Mutant s vyřazenými dvěma geny najednou |
| Drp1 | Dynamin related protein 1 | Protein příbuzný dynaminu |
| Dyn2 | Dynamin 2 | |
| ER | Endoplasmatic reticulum | Endoplazmatické retikulum |
| Fis1 | Mitochondrial fission 1 protein | Protein mitochondriálního dělení 1 |
| FRET | Förster resonance energy transfer | Försterův rezonanční přenos energie |
| GED | GTPase effector domain | GTPázová efektorová doména |

| | | |
|-----------|--|--|
| GTP | Guanosine triphosphate | Guanosin trifosfát |
| HR | Heptad repeats | |
| HRK | Harakiri | |
| IAP | Inhibitor of apoptosis protein | Inhibitor apoptózy |
| IBM | Inner boundary membrane | Vnitřní okrajová membrána |
| IMM | Inner mitochondrial membrane | Vnitřní mitochondriální membrána |
| IMS | Intermembrane space | Mezimembránový prostor |
| IOpa1 | Long Optic atrophy protein 1 | Dlouhá forma proteinu optické atrofie 1 |
| MAM | Mitochondria-associated membrane | Membrána endoplasmatického retikula asociovaní s mitochondrií |
| MAPL | mitochondrial anchored RING-finger containing protein | Mitochondriálně vázaný protein obsahující RING-finger doménu |
| Mcl-1 | Myeloid cell leukemia 1 | Protein buněk myeloidní leukemie 1 |
| Mcl-1ES | Extra short Mcl-1 | Extrakrátká forma Mcl-1 proteinu |
| Mcl-1L | Long Mcl-1 | Dlouhá forma Mcl-1 proteinu |
| Mcl-1S | Short Mcl-1 | Krátká forma Mcl-1 proteinu |
| mdivi-1 | Mitochondrial division inhibitor 1 | Inhibitor mitochondriálního dělení 1 |
| Mff | Mitochondrial fission factor | Faktor mitochondriálního dělení |
| Mfn1,2 | Mitofusin 1 and 2 | |
| MICOS | Mitochondrial contact site and cristae- organizing system | Systém organizující mitochondriální kontaktní místa a kristy |
| MiD 49/51 | Mitochondrial dynamics protein 49 and 51 | Protein mitochondriální dynamiky 49 a 51 |
| MOMP | Mitochondrial outer membrane permeabilization | Permeabilizace vnější mitochondriální membrány |
| mt | Mitochondrion | Mitochondrie |
| MtDNA | Mitochondrial DNA | Mitochondriální deoxyribonukleová kyselina |
| Noxa | Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 | |
| Oma1 | OMA1 zinc metallopeptidase | Mitochondriální proteáza Opa1 |
| OMM | Outer mitochondrial membrane | Vnější mitochondriální membrána |
| Opa1 | Optic atrophy protein 1 | Protein optické atrofie 1 |
| PARL | presenilin-associated rhomboid-like protease | |
| PPD1 | FKBP52 peptide | Inhibitor calcineurinu |

| | | |
|-------------|---|---|
| Puma | p53-upregulated modulator of apoptosis | Modulátor apoptózy regulovaný pomocí p53 |
| ROMO 1 | ROS modulator 1 | Modulátor reaktivních forem kyslíku 1 |
| ROS | Reactive oxygen species | Reaktivní formy kyslíku |
| Smac/Diablo | Second mitochondria-derived activator of caspases/ direct IAP binding protein with low pI | Druhotný aktivátor kaspáz odvozený od mitochondrií/protein vážící přímo inhibitory apoptózy s nízkým pI |
| sOpal | Short Optic atrophy protein 1 | Krátká forma proteinu optické atrofie 1 |
| STED | Stimulated emission depletion microscopy | Mikroskopie vyčerpání stimulovanou emisí |
| STS | Staurosporine | Staurosporin |
| SUMO | Small ubiquitin-like modifier | Malý protein podobný ubikvitinu |
| tBid | Truncated Bid | Zkrácená (aktivní) forma Bid |
| UPR | Unfolded protein response | Odpověď na nesložené proteiny |
| VD | Variable domain | Variabilní doména |

Obsah:

| | |
|--|----|
| 1. Úvod..... | 1 |
| 2. Mitochondriální dynamika | 2 |
| 2.1. Mitochondriální fúze | 2 |
| 2.1.1. Fúze vnější mitochondriální membrány – Mitofusin 1 a 2..... | 3 |
| 2.1.2. Fúze vnitřní mitochondriální membrány – Opa 1 | 3 |
| 2.2. Dělení mitochondrií..... | 4 |
| 2.2.1. Kontakt mitochondrie s endoplazmatickým retikulem..... | 4 |
| 2.2.2. Drp1 – Dynamin related protein 1 | 5 |
| 2.2.3. Drp1 koreceptory v OMM..... | 6 |
| 2.2.4. Dyn2 – Dynamin 2 | 6 |
| 3. Apoptóza | 7 |
| 3.1. Vnitřní apoptotická dráha | 8 |
| 3.1.1. Přehled Bcl-2 proteinů..... | 8 |
| 3.1.2. Mechanismus vnitřní apoptotické dráhy..... | 8 |
| 4. Vliv proteinů Bcl-2 rodiny na dynamiku mitochondrií | 10 |
| 4.1. Bax a Bak | 10 |
| 4.2. Mcl-1 | 10 |
| 4.3. Bcl-xL..... | 10 |
| 5. Dynamika mitochondrií v apoptóze | 11 |
| 5.1. Dělení mitochondrií v apoptóze | 11 |
| 5.1.1. Role DRP1 v apoptóze | 11 |
| 5.1.2. Dyn2 v apoptóze..... | 14 |
| 5.1.3. Fis1 v apoptóze..... | 14 |
| 5.1.4. MiD49/51 a Mff v apoptóze | 14 |
| 5.2. Proteiny mitochondriální fúze v apoptóze..... | 14 |
| 6. Remodelace krist | 15 |
| 7. Závěr..... | 17 |
| 8. Použitá literatura..... | 20 |

1 Úvod

Mitochondrie jsou semiautonomní buněčné organely zastávající širokou škálu funkcí, z nichž nejdůležitější je efektivní získání energie ve formě adenosin trifosfátu (ATP) z katabolických dějů. Představa, že mitochondrie kopírují tvarem své bakteriální předky a vytváří jakési ledvinovité útvary, byla nahrazena modelem mitochondriálního retikula. V každé mitochondrii nalézáme čtyři kompartmenty – vnější membránu (outer mitochondrial membrane, OMM), vnitřní membránu (inner mitochondrial membrane, IMM), mezimembránový prostor (intermembrane space, IMS) a mitochondriální matrix. Vnější membrána je hladká a obsahuje přenašeče a poriny, skrze které mohou procházet malé molekuly (voda, aminokyseliny apod.) nikoliv však velké proteiny. Díky elektronové tomografii bylo zjištěno, že vnitřní mitochondriální membrána kopíruje tvar vnější a vzniká tak vnitřní okrajová membrána, (inner boundary membrane, IBM) ze které vybíhají krysty. Prostor krist a mezimembránový prostor jsou spojeny úzkým hrdlem – cristae junction. Díky omezenému propojení se může elektrochemický gradient na vnitřní membráně, složení membrány i lokální koncentrace aktivních látek a metabolitů v rámci jedné mitochondrie lišit (Frey et al., 2002).

Mitochondriální ATP je produkován v procesu oxidativní fosforylace. Proteiny respiračního řetězce zajišťují tvorbu protonového gradientu (mitochondriálního membránového potenciálu) na IMM, který slouží k výrobě ATP. Stavba vnitřní mitochondriální membrány je vysoce ovlivněna přítomností komplexů dýchacího řetězce. Tato skutečnost úzce spřahuje morfologii mitochondrií s její hlavní funkcí – buněčným dýcháním. Stavba krist přímo ovlivňuje efektivitu respiračního řetězce. Neopomenutelným mechanismem regulace mitochondriálních procesů je tedy také remodelace krist (Cogliati et al., 2013).

Stavba mitochondrií se různí mezi buněčnými typy. Například neurony či buňky svalové mají velký energetický výdej, jejich vnitřní mitochondriální membrána je proto bohatě zřasena a krysty mají lamelární tvar (Perkins et al., 2001). Naopak některé nádorové buňky mají potlačenou oxidativní fosforylaci (Warburgův efekt) a jejich mitochondrie téměř ztrácejí krysty (Calabrese et al., 2013).

Mitochondrie jsou velmi dynamické a mitochondriální retikulum neustále podléhá přestavbě. I ve tkáních, kde je struktura mitochondrií zdánlivě stabilní, neustále probíhá fúze a dělení mitochondrií, čímž lze zamezit hromadění disfunkcí způsobených poškozenou DNA (Nakada et al., 2001).

Zatímco IMM zajišťuje buněčnou respiraci, OMM je místem indukce vnitřní apoptotické dráhy vedoucí k buněčné smrti. Apoptóza je programovaná buněčná smrt, která je fyziologická, nevyvolává imunitní odpověď a je nezbytným procesem ve vývoji organismu (Elmore, 2007). Přestože byla již před více než sedmdesáti lety popsána fragmentace mitochondrií při porušení buněk (Claude and Fullam, 1945), její důvod a mechanismus nejsou zatím zcela objasněny. Zapojení proteinů mitochondriální dynamiky do tohoto procesu je neoddiskutovatelné, zdá se ale, že se neúčastní jen jako nástroje pro dělení mitochondrií, ale mohou mít i další funkce spojené s buněčnou smrtí. Stejně jako se proteiny mitochondriální dynamiky účastní apoptotické dráhy, tak apoptotické proteiny (Bcl-2 rodiny) bezprostředně ovlivňují dynamiku mitochondrií ve zdravé buňce.

Stále diskutovanější jsou také kontakty mitochondrie s endoplazmatickým retikulem, které jsou esenciální pro dělení mitochondrií a hrají důležitou roli ve vnitřní apoptotické dráze (Rowland and Voeltz, 2012).

Cílem práce je shrnutí poznatků o mitochondriální fragmentaci v apoptóze, vlivu proteinů mitochondriální dynamiky na průběh vnitřní apoptotické dráhy a vlivu apoptotických proteinů na remodelaci mitochondriálních membrán v savčích buňkách.

2 Mitochondriální dynamika

Základní vlastností živé hmoty je schopnost růst a rozmnožovat se – na buněčné úrovni dělit se. Při dělení buněk dochází k fragmentaci mitochondriálního retikula, aby i mitochondrie byly ekvivalentně rozděleny mezi dceřiné buňky. Nejedná se však o jedinou příležitost k mitochondriálnímu dělení. To je též důležité pro distribuci mitochondrií v buňce, především v neuronu (Mishra and Chan, 2014).

Fúze mitochondrií se na první pohled nemusí zdát tak samozřejmou, je to ale proces pro eukaryotické buňky nezbytný. Dělení a fúze mitochondrií je totiž cestou, jak se vypořádat s poškozenými organelami. Pakliže poškození překročí určitou hranici, je možno nefunkční část oddělit od mitochondriálního retikula a zbavit se jí procesem mitofágie (Youle and Narendra, 2011). Naopak částečně poškozená mitochondrie může fúzovat s plně funkčními organelami, které nahradí chybějící funkci (Nakada et al., 2001). Mitochondriální fúze tudíž udržuje distribuci zdravé mtDNA a komunikaci mezi mitochondriemi. Díky fúzi mitochondrií také dochází k rovnoměrnému rozložení membránových proteinů a jednotlivé mitochondrie tak tvoří homogenní skupinu (Weaver et al., 2014). Fúze mitochondrií je také obecnou adaptací na velké množství stresových podnětů. Díky ní může například dojít k oddálení apoptózy (Tondera et al., 2009). Možnost měnit morfologii mitochondrií je též důležitá pro regulaci buněčného dýchání a udržení homeostázy.

Poruchy mitochondriální dynamiky jsou častým důvodem neurodegenerativních onemocnění. Neurony jsou zvláště náchylné na poruchy mitochondrií díky vysokým energetickým požadavkům, velikosti a silné polarizaci. Porucha či deplece proteinů zajišťujících fúzi mitochondrií vedou k Charcot-Marie-Tooth syndromu a dominantní oční atrofii. Poruchy mitochondriální dynamiky jsou ale patrné i v Parkinsonově, Alzheimerově a Huntigtonově chorobě (Itoh et al., 2013).

2.1 Mitochondriální fúze

Jelikož je mitochondrie dvoumembránová organela, fúze probíhá ve dvou krocích. Fúzi vnějších membrán savčích buněk zajišťují Mitofusin 1 a 2 (Mfn1, Mfn2), zatímco fúzi vnitřních membrán a synchronizaci obou procesů řídí Optic atrophy protein 1 (Opa1). Fúze vnější a vnitřní membrány probíhají *in vivo* synchronně, experimentálně však lze tyto dva procesy oddělit (Malka et al., 2005).

V buňkách negativních na Opa1 probíhá fúze OMM, ale k fúzi vnitřní membrány již dojít nemůže (Hoppins et al., 2011).

Mitochondriální fúze je zprostředkovaná GTPázami asociovanými s mitochondriálními membránami. Fúze membrán je z toho důvodu závislá na GTP, zatímco ATP není potřeba. Fúzovat mohou mitochondrie s nenarušeným elektrochemickým potenciálem, zatímco mitochondrie s výrazně sníženým elektrochemickým potenciálem jsou z fúzního procesu vyloučeny. Je to zřejmě proto, že Opa1 je při disipaci mitochondriálního potenciálu štěpen proteázou Oma1 (Hoppins et al., 2011; Malka et al., 2005). Toto zřejmě zajišťuje, aby se silně poškozené mitochondrie nezapojovaly zpět do retikula.

2.1.1 Fúze vnější mitochondriální membrány – Mitofusin 1 a 2

Mitofusin 1 a 2 (Mfn1,2) jsou esenciální pro embryonální vývoj jedince (Chen et al., 2003) a udržení homeostázy. Narušení mitochondriální dynamiky vede k zásadnímu vlivu na jejich bioenergetiku, a tedy metabolismus celé buňky (Chen et al., 2005).

Mfn 1 a 2 prochází dvakrát přes OMM, N i C konec proteinu je obrácen do cytosolu. Na N konci je vysoce konzervovaná doména s GTPázovou aktivitou. Protein obsahuje dvě oblasti heptad repeats (HR1 a HR2) – sekvence hydrofobních aminokyselin, díky nimž může dojít k přiblížení dvou membrán. Díky jejich hydrofobicitě vzniká coiled coil dimer (Koshiba et al., 2004). Mfn1,2 tvoří mezi sebou homodimery i heterodimery. Heterotypická vazba je více afinní a fúze tedy pravděpodobnější. Poměr Mfn1 a Mfn2 v membránách je tkáňově specifický a lze jím regulovat míru fúze mitochondrií (Hoppins et al., 2011).

Mitofusin 1 a 2 mají velice podobnou strukturu i funkci (podle analýzy cDNA jsou z 60 % identické). Mfn1 se exprimuje ve většině tkání více než Mfn2, ale v kosterní a především srdeční svalovině je silnější produkce Mfn2 (Santel et al., 2003). Proteiny tedy nejsou navzájem stoprocentně záměnné. Liší se i jejich interakce s dalšími proteiny mitochondriální dynamiky (Cipolat et al., 2004), ale také s proteiny apoptotické kaskády.

2.1.2 Fúze vnitřní mitochondriální membrány – Opa1

Opa1 je protein z rodiny GTPáz podobných dynaminu. Je zanořen do vnitřní mitochondriální membrány a jeho hlavní část je obrácena do mezimembránového prostoru. Alternativním sestřihem exonu 4, 4b a 5b je produkováno osm isoform Opa1. Vystřížení daných exonů nemění čtecí rámec, jednotlivé isoformy se tedy liší pouze svou N-koncovou doménou. Zastoupení jednotlivých produktů alternativního sestřihu je tkáňově specifické (Delettre et al., 2001).

Všech osm isoform je po transportu upravováno mitochondriálními proteázami. Každé molekule Opa1 je uštěpena mitochondriální směrovací sekvencí za vzniku dlouhé isoformy lOpa1. Další proteázy štěpí Opa1 na kratší formy sOpa1 (Ishihara et al., 2006). Dlouhé i krátké isoformy jsou lokalizovány v mezimembránovém prostoru, ale sOpa1 již nejsou kotvené v IMS. Zatímco dlouhé isoformy jsou

esenciální, ale také dostačující pro fúzi IMM (Anand et al., 2014), krátké isoformy nejsou samy schopny fúzi uskutečnit. Pro správnou dynamiku mitochondrií jsou ale nutné obě varianty. Zastoupení lOpa1 a sOpa1 je za normálních podmínek ekvimolární. Nízká hladina ATP, signál k apoptóze nebo narušení membránového potenciálu spouští štěpení lOpa1 (Ehses et al., 2009). Krátké isoformy Opa1 a další proteiny mitochondriální dynamiky mají úlohu v remodelaci krist nezávislou na dynamice mitochondrií, která je rozvedena níže. Část sOpa1 se také překvapivě vyskytuje v místech dělení, tedy v místech kontaktu mt s ER a nasedání Drp1. Funkce tohoto proteinu v mitochondriálním dělení je stále neznámá, ale mohlo by jít o místo propojení dělení s fúzí, a tedy regulace konečné morfologie mitochondrií. Dalším možným důvodem přítomnosti sOpa1 v místě dělení mitochondrií je citlivost Opa1 na stres díky přítomnosti proteáz, které štěpí Opa1. Opa1 tedy může působit jako prostředník pro předání informace o stresu mitochondriálnímu mechanismu dělení (Anand et al., 2014).

2.2 Dělení mitochondrií

Esenciální roli v dělení mitochondrií má u savců Drp1 (Dynamamin related protein 1). Drp1 je v klidovém stavu lokalizovaný v cytosolu. Při iniciaci dělení mitochondrie je vázán do míst dělení závisle na endoplazmatickém retikulu a koreceptorech lokalizovaných v OMM. Těmi jsou především Mff (mitochondrial fission factor), Fis1 a MiD49/51.

Celý proces lze zjednodušeně rozdělit do tří fází. V prvním kroku je mitochondrie zaškrcena endoplazmatickým retikulem, poté kolem mitochondrie polymerizuje prstenec Drp1 a nakonec dochází k vlastnímu zaškrcení za účasti Dyn2 (Lee et al., 2016).

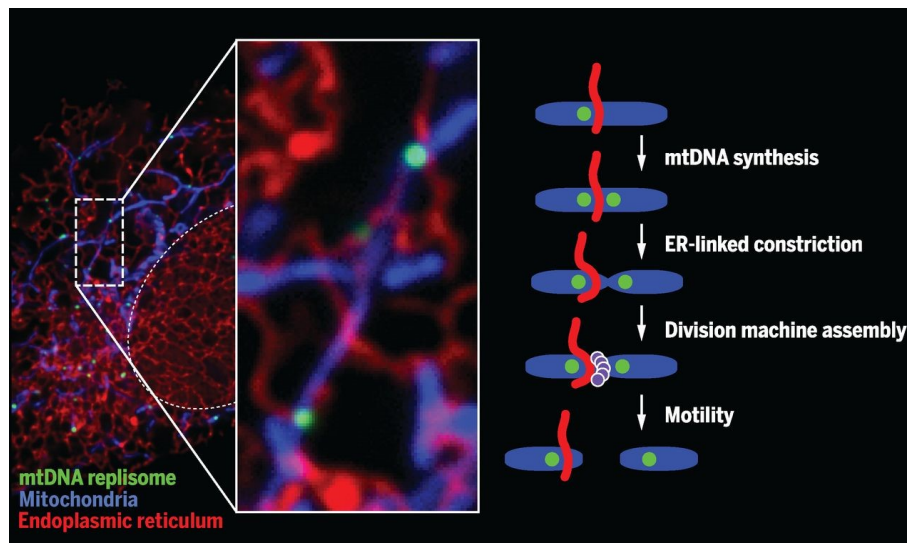
2.2.1 Kontakt mitochondrie s endoplazmatickým retikulem

Endoplazmatické retikulum (ER) není izolovanou organelou, ale je v přímém (nejen signálním, ale také prostorovém) kontaktu s většinou buněčných struktur. ER je v blízkosti mitochondrií tvořeno MAM (mitochondria-associated membrane), která obsahuje proteiny nezbytné pro syntézu fosfolipidů mitochondriálních membrán. ER je pro mitochondrie také zdrojem Ca^{2+} . Tok Ca^{2+} z ER do mitochondrií je jedním z mechanismů aktivace apoptotické dráhy (Rowland and Voeltz, 2012).

Díky fluorescenční mikroskopii bylo zjištěno, že mitochondrie se nejčastěji dělí právě v místě kontaktu s ER. Mff a MiD49/51 jsou lokalizovány do míst kontaktu mitochondrie s ER a slouží jako kotvy pro cytosolický Drp1. Vazba Drp1 na OMM a jeho oligomerizace je následována rozdělením mitochondriálního tubulu. Běžný průměr mitochondriálního tubulu je ale mnohem větší než průměr Drp1 helixu. ER se v kontaktních místech ovíjí kolem mitochondriálního tubulu a vytváří tak zúžení – místo budoucího zaškrcení mitochondrie. Průměr zaškrceného mitochondriálního tubulu je srovnatelný s velikostí Drp1 helixu vázaného do OMM (Friedman et al., 2011). V místě kontaktu s ER je v mitochondriích vyšší obsah Ca^{2+} , což má za následek zvýšení aktivity Drp1 prostřednictvím calcineurinu (Cereghetti et al., 2008). Zdá se, že kontakt mitochondrie s endoplazmatickým retikulem zajišťuje Mfn2, který se nachází nejen v OMM, ale také v MAM (Naon et al., 2016). Bude ještě

diskutováno, že proteiny mitochondriální dynamiky zastávají v buňce další funkce nezávisle na své roli v dělení a fúzi mitochondriálních membrán.

Souběžně s dělením mitochondrií musí docházet také k dělení mtDNA, aby bylo zajištěno, že každá mitochondrie bude obsahovat alespoň jednu kopii. Pomocí konfokální mikroskopie byl zjištěno, že replikující se mtDNA se nachází v místě kontaktu s ER, kde dochází k dělení mitochondrií. Replikující se mtDNA dokonce predikuje místa budoucího dělení. Tam, kde byla detekována replikující se mtDNA, byl později navázán Drp1 a došlo k rozdělení organely (Obr. 1) (Lewis et al., 2016).



Obr. 1 Mitochondriální dělení je závislé na kontaktu s ER a je předem značeno replikací mtDNA (Lewis et al., 2016).

2.2.2 Drp1 – Dynamin related protein 1

Drp1 je velká GTPáza příbuzná dynaminu lokalizovaná v cytoplasmě ve formě dimerů nebo tetramerů. Pro aktivitu Drp1 je vyžadována přítomnost nejen GTP, ale také ATP. ATP udržuje Drp1 v požadované konformaci nezbytné pro tvorbu oligomeru (Montessuit et al., 2010). Za normální situace se většina Drp1 nachází v cytoplasmě, pouze asi 3% množství Drp1 je lokalizováno na mitochondriích (Smirnova et al., 2001).

Drp1 se skládá z N-koncové domény s GTPázovou aktivitou, C-koncové GED (GTPase effector domain), VD (variabilní domény) a střední domény, která zajišťuje oligomerizaci. Podle kryoelektronové mikroskopie příbuzného dynaminu se předpokládá, že DRP1 tvoří strukturu, kde lze rozlišit stonek (stalk), hlavu (head) a nohu (leg). GED a střední doména tvoří coiled coil strukturu a vytváří tak stonek, hlavu tvoří GTPázová doména a nohu VD doména (Chappie et al., 2010).

Dělení mitochondrií závislé na Drp1 probíhá ve třech krocích: navázání Drp1 na OMM, oligomerizace Drp1 a konstriktace kruhového oligomeru kolem mitochondrie. Oligomerizace Drp1 je nezbytná pro zajištění GTPázové aktivity. Když Drp1 polymeruje natolik, že obtočí mitochondrii, hydrolyzuje GTP a zaškrtí membránu (Smirnova et al., 2001).

Drp1 se váže do ohnisek dělení (z anglického fission foci) na OMM. Vazba Drp1 na OMM je též závislá na lipidickém složení. Pro vazbu Drp1 na OMM je esenciální cardiolipin, naopak kyselina fosfatidová inhibuje integraci Drp1 s OMM a působí tak jako negativní regulátor mitochondriálního dělení. Drp1 se váže do membrány pomocí své stonkové a variabilní domény, které obsahují hydrofobní aminokyseliny (Adachi et al., 2016).

2.2.3 Drp1 koreceptory v OMM

Pro vazbu na OMM využívá Drp1 proteinové koreceptory. V savčích buňkách je známo několik proteinů, které by mohly hrát tuto roli. Dobře popsáný je mitochondrial fission factor (Mff), který je svou C-koncovou doménou ukotvený v OMM směrem do cytosolu a svým N-koncem přímo váže Drp1. Tato interakce je dynamická, aby bylo možné udržet poměr cytosolického a mitochondriálně vázaného Drp1 (Otera et al., 2010).

Další koreceptor, Fis1, je popsán hlavně v buňkách kvasinek, kde tvoří ohniska dělení a slouží k vazbě Drp1 na OMM. V savčích buňkách funkce Fis1 zatím není zcela jasná a jeho deplece nevede k inhibici lokalizace Drp1 na OMM (Lee et al., 2004; Otera et al., 2010).

MiD49 – Mitochondrial dynamics protein 49 a MiD51 jsou dva příbuzné proteiny. MiD49/MiD51 podobně jako Mff váží Drp1 k OMM. Tyto proteiny vytvářejí ohniska a kroužky, které mohou sloužit jako lešení pro uchycení Drp1. Díky rozdílu distribuce těchto dvou variant dochází ke změnám v morfologii mitochondrií (Palmer et al., 2011). MiD49/MiD51 vytváří vazebné místo pro Drp1 nezávisle na Mff v místě kontaktu s ER. Při depleci jednoho či druhého z těchto proteinů dochází k poklesu frekvence dělení mitochondrií, ale ne k jeho úplnému zastavení. To dokazuje, že tyto dva proteiny mají zástupnou funkci (Otera et al., 2016).

Existuje teorie, že Fis1, Mff, a MiD49/51 se podílejí na dělení mitochondrií nezávisle na sobě, jejich funkce se alespoň částečně překrývají a jsou tedy vzájemně do jisté míry zastupitelné (Losón et al., 2013; Otera et al., 2016). Liu a Chan ukazují, že zatímco MiD49/51 váží Drp1 ve formě dimerů, Mff má afinitu k oligomerům Drp1. Každý z proteinů tedy váže jinou subpopulaci cytoplazmatického Drp1 (Liu and Chan, 2015). Nicméně myšlenku, že jednotlivé proteiny kotví Drp1 do OMM pracují nezávisle na sobě, narušuje jejich těsná kolokalizace do ohniska dělení. Pomocí FRET bylo ukázáno, že zmíněné proteiny spolu navzájem interagují a že jsou součástí jednoho aparátu zajišťujícího dělení mitochondrií (Elgass et al., 2015). Teprve další výzkum odhalí nakolik proteiny vázané do ohniska dělení spolupracují a jak se jejich funkce liší v závislosti na tkáňové specifitě či typu signalizace.

2.2.4 Dyn2 – Dynamamin 2

Nedávný výzkum (Lee et al., 2016) odhalil, že Drp1 není jediným proteinem z rodiny dynaminů, který se účastní dělení mitochondrií. Esenciální pro zaškrcení mitochondriální membrány je Dynamamin 2, který byl dosud identifikován v endocytické dráze (Ferguson and De Camilli, 2012). Dyn2 se účastní

procesu dělení až po jeho iniciaci pomocí Drp1. Prvně tedy dochází ke koncentraci Drp1 v místě dělení a až poté k navázání Dyn2. Zdá se, že Drp1 zúží průměr mitochondriálního tubulu, ale není schopen membránu zcela zaškrtit a mitochondrii rozdělit. K tomu slouží právě Dyn2. Při depleci Dyn2 byly pozorovány prodloužené mitochondrie – neschopné se dělit. Poškození či nepřítomnost Dyn2 může vést k neurodegenerativním poruchám zahrnujícím i Charcot-Marie-Tooth syndrom (Gonzalez-Jamett et al., 2014).

3 Apoptóza

Buněčná smrt může mít několik forem, ale mitochondriální dynamika hraje důležitou roli hlavně pro regulovanou formu buněčné smrti zvanou apoptóza. Apoptóza je programovaná buněčná smrt zajišťující odstranění nefunkční či nepotřebné buňky bez aktivace imunitní odpovědi a likvidace odumřelé buňky beze zbytku. Je přirozeným fyziologickým pochodem (nejtypičtějším příkladem je vývoj nervového a imunitního systému), ale také obranným mechanismem při napadení organismu. Deregulace apoptotických drah je příčinou vážných chorob – rakovinné buňky mohou být vůči apoptóze rezistentní, zatímco nadměrná senzitivita k proapoptotickým signálům může vést k neurodegenerativním poruchám. Při apoptóze dochází ke zmenšení objemu buňky, zahuštění cytoplazmy, fragmentaci a kondenzaci chromatinu. Průvodním jevem je tvoření puchýřků na plazmatické membráně a odškrcování částí buňky - tvorba apoptotických tělísek (Elmore, 2007). Umírající buňka vysílá signály, které slouží jako chemoatraktanty pro fagocytující buňky. Jsou jimi především lysofosfatidylserin, fraktalin, ATP a sphingosin-1-fosfát (Ravichandran, 2010). Fagocyt rozpoznává signály apoptotické buňky mimo jiné v podobě zvýšené přítomnosti fosfatidylserinu na povrchu buňky (Bratton et al., 1997). Apoptotická tělíška jsou pak fagocytována a strávena v lysosomech. Apoptóza může být spuštěna vnějším nebo vnitřním stimulem. Vnější způsob spuštění programované buněčné smrti je závislý na TNF (tumor necrosis factor), FAS a TRAIL receptorech v plazmatické membráně (death receptors), které po navázání ligandu aktivují apoptotickou dráhu prostřednictvím kaspázy 8. Kaspázy jsou skupina cysteinových proteáz, jejichž část se podílí na iniciaci apoptotické kaskády, která aktivuje výkonné kaspázy se širokou škálou substrátů podléhajících degradaci či naopak aktivaci štěpením. Účinkem kaspáz dochází mimo jiné k degradaci inhibitorů apoptózy, aktivaci nukleáz a degradaci strukturních proteinů (Elmore, 2007).

Ve vnitřní apoptotické dráze hrají klíčovou roli mitochondrie, a proto se jí v následujících řádcích budu podobněji věnovat. Díky účinku kaspázy 8 na BH3-only proteiny dochází k provázání vnější a vnitřní apoptotické dráhy a díky tomu k amplifikaci pro-apoptotického signálu (Li et al., 1998).

3.1 Vnitřní apoptotická dráha

Programovaná buněčná smrt může být spuštěna signálem pozitivního i negativního rázu, tedy jak proapoptotickou událostí, tak oslabením protiapoptotických pochodů. Hlavními iniciátory mitochondriální apoptotické dráhy jsou Bcl-2 proteiny. Mitochondrie poté spouští aktivaci kaspáz uvolněním cytochromu c do cytoplasmy. Aby mohl být cytochrom c z mitochondrie uvolněn, musí být permeabilizována vnější mitochondriální membrána (MOMP – mitochondrial outer membrane permeabilization) a musí dojít k otevření cristae junctions. Cytochrom c je poté součástí cytoplazmatického apoptosomu, ve kterém dochází k aktivaci iniciační kaspázy 9 (Czabotar et al., 2014).

3.1.1 Přehled Bcl-2 proteinů

Proteiny Bcl-2 rodiny (z anglického B-cell lymphoma) jsou hlavními regulátory mitochondriální apoptotické dráhy. Tyto proteiny obsahují homologní domény, které jsou označovány jako BH 1-4 (Bcl-2 homology domain). Proteiny Bcl-2 rodiny lze rozdělit do tří podskupin: antiapoptotické proteiny, proapoptotické proteiny a proteiny obsahující pouze BH3 doménu (BH3-only proteiny).

Antiapoptotické proteiny (Bcl-2, Bcl-2-related gene A1 (A1 také znám jako BFL1), Bcl-B, Bcl-xL, Bcl-w a Mcl-1) chrání integritu vnější mitochondriální membrány. Mezi proapoptotické (efektorové) proteiny patří Bak, Bax a Bok. Bax a Bak při vazbě na OMM oligomerizují a způsobují MOMP, a tedy vyhlídnou cytochromu c do cytosolu. BH3-only proteiny se dělí na přímé aktivátory (Bim, Bid), které aktivují efektorové proteiny a senzitivátory (Bad, Bik, Bmf, bNIP3, HRK, Noxa a Puma), které se vážou na antiapoptotické proteiny a tím je neutralizují (Czabotar et al., 2014). BH3-only proteiny používají BH3 doménu k interakci s pro- nebo antiapoptotickými proteiny. Ty mají ve své struktuře hydrofobní žlábk, do kterého se váže amfipatická BH3 doména (Hinds et al., 2007).

3.1.2 Mechanismus vnitřní apoptotické dráhy

Signálem pro zahájení vnitřní apoptotické signalizace může být poškození DNA (signalizace p53), porucha v syntéze proteinů (UPR – unfolded protein response), oxidativní stres (ROS – reactive oxygen species), aktivace onkogenů nebo nedostatek signálů pro přežití. Tyto signály se přenáší na BH3-only proteiny, které modulují aktivitu členů Bcl-2 rodiny. Hlavním představitelem BH3-only proteinů je Bid, který je aktivován štěpením (mimo jiné také kaspázami) a jeho aktivní forma (tBid) způsobuje oligomerizaci Bax a Bak v OMM.

Existují dva modely, jak BH3-only proteiny mohou aktivovat Bax nebo Bak. Model přímé aktivace říká, že Bim a tBid se vážou přímo na Bax nebo Bak a zprostředkovávají jejich aktivaci. V modelu nepřímé aktivace se vážou BH3-only proteiny na antiapoptotické Bcl-2 proteiny, čímž nepřímo způsobí aktivaci Bax a Bak (Kuwana et al., 2005). Pravděpodobně jsou možné oba modely a fungují společně (Llambi et al., 2011).

Zatímco Bak je ve zdravé buňce umístěn v OMM, ale svou apoptotickou funkci zastává až po obdržení apoptotického stimulu, Bax je převážně cytosolický a jeho aktivace způsobí translokaci do OMM. Bax má jistou afinitu k OMM, ale je dynamicky udržován mimo mitochondrie pomocí Bcl-xL, který vyvazuje Bax z OMM zpět do cytosolu. Zvýšení koncentrace Bax na OMM při apoptóze může být tedy způsobeno jak aktivací Bax, tak deaktivací Bcl-xL. Během apoptózy BH3-only proteiny způsobují oligomerizaci Bax a Bak, které pak vnější mitochondriální membránu permeabilizují (MOMP) (Czabotar et al., 2014).

Aktivace Bax (tedy spuštění apoptózy) je také závislá na složení OMM. Integraci Bax do membrány inhibuje membránový cholesterol. Vyšší obsah cholesterolu v OMM tedy může chránit buňku před apoptózou. Díky tomu při apoptóze dochází k vytváření pórů v OMM, ale ne v plazmatické membráně, která má vyšší obsah cholesterolu než membrána mitochondriální (Christenson et al., 2008). Naopak aktivační funkci má cardiolipin – negativně nabitý mitochondriální fosfolipid. Bez jeho přítomnosti Bax nedokáže permeabilizovat membránu (Kuwana et al., 2002). Cardiolipin je místem vazby tBid a Drp1 na OMM. Pro vazbu Bax do OMM jsou také důležité sfingolipidy, především ceramid (Chipuk et al., 2012).

Mechanismus permeabilizace OMM proteiny Bax a Bak není zcela jasný. Díky superrezoluční STED mikroskopii bylo zjištěno, že tisíce molekul Bax tvoří prstencové útvary na OMM. Přítomnost prstenců Bax molekul vždy korelovala s delokalizací cytochromu c z IMS (Große et al., 2016). Teorie peptidického póru je asi nejpříjemnější, nicméně bylo zjištěno, že dochází k úniku molekul větších, než jsou tyto póry. Proto bylo navrženo, že pór je tvořen lipidovými molekulami a jeho průměr může být větší. Jak již bylo řečeno, Bax se váže na sfingolipid ceramid, který se účastní tvorby póru. Ceramid je schopen tvořit póry v membráně dokonce i nezávisle na Bax (v umělých podmínkách – v membránách bez proteinové složky, nicméně *in vivo* je zřejmě k aktivaci ceramidu Bax potřeba). Tento sfingolipid také váže Bcl-xL, který inhibuje tvorbu ceramidového póru. Kvůli interakci ceramidu s Bcl-2 proteiny je těžké určit, zda apoptotickou MOMP způsobuje lipidický či proteinový pór (Chang et al., 2015).

Po MOMP dochází k uvolnění proapoptotických faktorů do cytoplasmy. Nejdůležitějším je již zmíněný cytochrom c. Cytochrom c je protein respiračního řetězce, který se nachází v IMS. Protože IMM tvoří vnitřní kompartmenty – kristy, ve kterých je cytochrom c uvězněn, je nutné tyto struktury rozvolnit, aby do cytosolu proniklo dostatečné množství cytochromu c. K tomu slouží systém remodelace krist. Když je cytochrom c uvolněn do cytosolu tvoří zde společně s proteinem Apaf-1 a prokaspázou-9 apoptosom. Dochází tak k aktivaci kaspázy 9 a ta poté aktivuje efektorové kaspázy 3 a 7. Z IMS dochází také k výlevu proteinů rodiny Smac/Diablo. Jedná se o proteiny vyvazující IAPs (inhibitory apoptózy) a přispívající tak k propagaci apoptotické signalizace. Dalšími proapoptotickými faktory uvolňovanými z IMS jsou nukleázy, např. AIF či Endonukleáza G (Elmore, 2007).

4 Vliv proteinů Bcl-2 rodiny na dynamiku mitochondrií

4.1 Bax a Bak

Bax a Bak jsou proapoptotickými členy Bcl-2 rodiny. Jejich dopad na mitochondriální dynamiku je ale patrný i ve zdravých buňkách. Bax má, kromě interakce s proteiny mitochondriální dynamiky, vliv také na pohyblivost mitochondrií (Sheridan et al., 2008).

Karbowski et al. studovali vliv Bax a Bak na mitochondriální dynamiku pomocí Bax/Bak DKO (double knockout) buněčných linií. Mitochondrie Bax/Bak DKO mutantů byly značně fragmentované, a to i při inaktivaci Drp1 pomocí dominantně negativní formy proteinu Drp1-K38A. Bax a Bak interagují s Mfn2 a zajišťují jeho správnou distribuci po OMM (Karbowski et al., 2006).

Také ze studia mutovaného Bax, který nebyl schopen tvořit oligomery, vychází závěr, že rozpuštěný cytoplazmatický Bax podněcuje mitochondriální fúzi díky interakci s Mfn2 (Hoppins et al., 2011).

4.2 Mcl-1

Ačkoliv se Mcl-1 řadí mezi antiapoptotické proteiny, bylo zjištěno, že jednotlivé jeho sestřihové isoformy se zásadně liší svou funkcí. Dlouhá varianta (Mcl-1L) se nachází v mitochondriálních membránách. V OMM má antiapoptotickou funkci díky vazbě na Bax, Bak a Bid, ale nachází se také v IMM, kde se účastní remodelace krist. Krátká isoforma (Mcl-1S) je cytosolická a extrakrátká (Mcl-1ES) je lokalizovaná v cytoplazmatické membráně a mají naopak proapoptotickou funkci. Krátké isoformy Mcl-1 interagují s dlouhými a tvoří tak heterodimery, které neutralizují funkce obou složek. Zda Mcl-1 podporuje či tlumí apoptózu závisí na poměru jeho sestřihových variant. Vychýlení poměru Mcl-1L/S na kteroukoliv stranu vede k apoptóze. Mcl-1 interaguje v OMM také s Drp1. Snížení množství Mcl-1L v OMM vedlo ke snížení aktivity Drp1, a tedy k omezení mitochondriálního dělení. Nicméně i buňky s takovými mitochondriemi umíraly apoptózou, což potvrzuje, že dělení závislé na Drp1 není nutné pro apoptotickou kaskádu (Morciano et al., 2016). O úloze Drp1 ve vnitřní apoptotické cestě pojednávám níže.

Mcl-1 má vliv nejen v remodelaci krist, ale zdá se, že působí také profúzně. Myocyty negativní na Mcl-1 měly fragmentované mitochondrie s volnými kristami. Mcl-1 neovlivňuje pouze morfologii mitochondrií, ale také oligomerizaci ATP syntázy, čímž je úzce navázán apoptotický aparát na respirační řetězec. To nasvědčuje, že Bcl-2 proteiny hrají roli nejen v mitochondriální apoptotické dráze, ale také v mitochondriální dynamice a energetice (Perciavalle et al., 2012).

4.3 Bcl-xL

Při vyšší expresi Bcl-xL mitochondrie častěji fúzovaly a docházelo tak k vyšší provázanosti mitochondriální sítě (Hoppins et al., 2011; Sheridan et al., 2008). Bcl-xL se váže na Mfn2, ale také na

Drp1 a zvyšuje jeho GTPázovou aktivitu. Zvýšená exprese Bcl-xL vede k nárůstu mitochondriální hmoty v neuronech (Berman et al., 2009).

Podobně jako Mcl-1, frakce Bcl-xL se nachází také v kristách vnitřní mitochondriální membrány, kde působí na dýchací řetězec prostřednictvím ATP syntházy. Bcl-xL též zabraňuje prostupování iontů skrze IMM a stabilizuje tak membránový potenciál (Chen et al., 2011).

Z těchto a mnoha dalších studií vyplývá, že proteiny Bcl-2 rodiny jsou nejen klíčovými hráči v mitochondriální apoptotické dráze, ale jsou také důležitými faktory v udržování správné mitochondriální dynamiky. Tato funkce ale nemusí být zcela oddělena od permeabilizace OMM. Bax a cBid podporují pučení membrány a její ohýbání, které může tvorbu pórů podporovat. Také není vyloučeno, že se proapoptotické proteiny Bcl-2 rodiny přímo účastní apoptotické fragmentace mitochondrií. Tvorba MOMP zřejmě úzce souvisí s mitochondriální dynamikou (Bleicken et al., 2016).

5 Dynamika mitochondrií v apoptóze

Fragmentace mitochondrií je dlouho známým fenoménem vnitřní apoptotické dráhy (Mancini et al., 1997). Tohoto děje se účastní proteiny mitochondriální dynamiky a proteiny Bcl-2 rodiny. Ačkoliv je Drp1 esenciální pro dělení mitochondrií, k apoptotické fragmentaci dochází i v buňkách bez Drp1 (Sheridan et al., 2008). Fragmentace mitochondrií je také nezávislá na kaspázách (Oettinghaus et al., 2016). Z jakého důvodu k fragmentaci dochází v apoptóze a jaký je její vztah k MOMP jsou otázky živé diskuze.

5.1 Dělení mitochondrií v apoptóze

5.1.1 Role DRP1 v apoptóze

Po navázání Bax na OMM, ale ještě před ztrátou mitochondriálního potenciálu a MOMP, lze sledovat zvýšení frakce Drp1 vázané na vnější mitochondriální membránu. Důvodem však není zvýšená afinita Drp1 k OMM, v apoptotické buňce se Drp1 váže k OMM stále stejně často jako v buňce zdravé. Ve zdravé buňce je ovšem Drp1 z OMM opět vyvazován a dynamicky se udržuje jeho nízká koncentrace v OMM. Po spuštění apoptózy je schopnost Drp1 vyvazovat se z OMM inhibována (Wasiak et al., 2007).

Cereghetti a kolektiv naopak ukazují, že vazba Drp1 na OMM je závislá na disipaci mitochondriálního membránového potenciálu. Snížení membránového potenciálu v mitochondriích vede k vypuštění Ca^{2+} z endoplazmatického retikula do cytosolu, kde aktivuje Ca^{2+} dependentní serinovou fosfatázu – calcineurin. Calcineurin defosforyluje Drp1 na Ser637 a Drp1 tak zůstává vázaný v OMM. Buňky produkující inhibitor calcineurinu – PPD1 mají prodloužené mitochondrie neschopné dělení, protože Drp1 se bez fosfatázové aktivity calcineurinu neváže do OMM. Mitochondrie takových

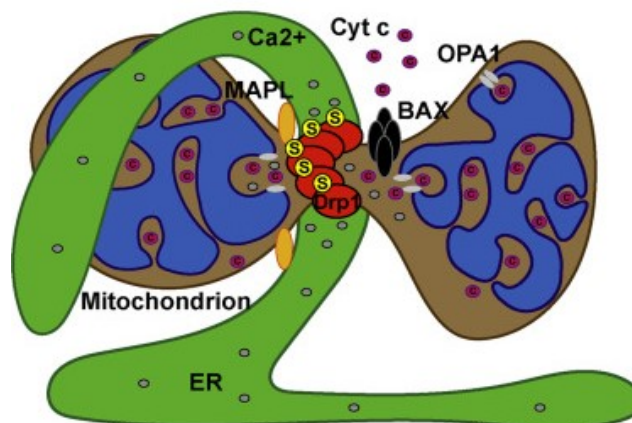
buněk nepodléhají v apoptóze ani fragmentaci, ani výlevu cyt c. Translokace Bax a výlev Smac/Diablo a AIF však zůstávají neporušené (Cereghetti et al., 2010; Cereghetti et al., 2008).

Integrace Drp1 do OMM je provázána také jeho SUMOylací. Drp1 kolokalizuje s BAX na OMM (Karbowski et al., 2002) a aktivace BAX/BAK způsobuje SUMOylaci Drp1, díky čemuž se Drp1 stabilně váže na OMM (Wasiak et al., 2007). SUMOylaci Drp1 provádí MAPL (mitochondrial anchored RING-finger containing protein) s E3 ligázovou aktivitou. SUMO stabilizuje oligomery Drp1 v OMM. MAPL také stabilizuje ER-mt kontakt a usnadňuje mitochondriální příjem Ca^{2+} z ER (Obr. 2) (Prudent et al., 2015).

Snížení hladiny Drp1 způsobuje oddálení výlevu cytochromu c (Cassidy-Stone et al., 2008; Estaquier and Arnoult, 2007). To vedlo k myšlence, že dělení mitochondrií a proteiny zajišťující tento proces jsou nezbytné pro propagaci vnitřní apoptotické dráhy. Bylo navrženo, že Drp1 zajišťuje apoptotickou fragmentaci mitochondrií a propaguje tak výlev cytochromu c (Frank et al., 2001). Potvrzuje to také studie využívající nebuněčných membránových struktur - liposomů (Montessuit et al., 2010), situace v živých buňkách však není tak jednoznačná.

Na modelu liposomů se Drp1 jeví jako faktor schopný zahájit oligomerizaci Bax v OMM. Drp1 se váže na cardiolipin a je schopen remodelovat membránu za vzniku hemifúzních intermediátů, které jsou místem oligomerizace Bax a indukce MOMP. Při studiu liposomů byla vazba Drp1 na membránu nepostradatelná pro tBid stimulovanou oligomerizaci Bax. Tvorba hemifúzních intermediátů je nezávislá na GTPázové aktivitě Drp1, nicméně je závislá na přítomnosti ATP a to ne kvůli jeho hydrolýze, nýbrž kvůli udržení Drp1 ve správné konformaci (Montessuit et al., 2010).

Vazbu Drp1 na OMM a jeho polymerizaci při apoptóze vyvolané staurosporinem (STS) lze inhibovat pomocí mdivi-1, inhibitoru Drp1 a mitochondriálního dělení. Bylo zjištěno, že mdivi-1 může potlačit apoptózu indukovanou STS díky inhibici MOMP – tedy zabránění výlevu cytochromu c. (Cassidy-Stone et al., 2008). Mdivi-1 má mimo jiné protirakovinné účinky. Byl zjištěn synergistický



Obr. 2 V apoptóze dochází ke kontaktům ER a mitochondrií za účasti MAPL, který zároveň SUMOyluje Drp1 a tím podněcuje apoptotickou fragmentaci mitochondrií (Prudent et al., 2015).

účinek s cis-platinou. Nicméně tento účinek byl patrný i v myších embryonálních fibroblastech s vyřazeným Drp1. To poukazuje na další místa účinku mdivi-1, především replikaci DNA (Qian et al., 2014). Ačkoliv mechanismus účinku mdivi-1 není zcela jasný, tato látka má potenciál v klinické praxi, především při ochraně před nežádoucí buněčnou smrtí po reperfuzi ischemických tkání (Wang et al., 2014).

Jiné studie ukazují, že dělení mitochondrií v apoptóze je spíše důsledkem buněčné smrti než její příčinou. Mitochondriální dělení závislé na Drp1 je od apoptózy dokonce možné experimentálně oddělit. K uvolnění cytochromu c do cytoplasmy a následné apoptóze došlo i v buňkách s retikulárními a kondenzovanými mitochondriemi. A naopak též v buňkách bez Drp1 dochází k fragmentaci mitochondrií při apoptóze (Sheridan et al., 2008).

Inhibice Drp1 pomocí RNA interference vedla k prodlužce ve výlevu cytochromu c po vystavení apoptotickému stimulu. Inhibice Drp1 tedy může apoptózu oddálit nikoliv však zcela zastavit a nezabrání uvolnění dalších proapoptotických proteinů, především Smac/DIABLO (Estaquier and Arnoult, 2007; Große et al., 2016). Oddálení apoptózy ale bylo pozorováno pouze při stimulaci peroxidem vodíku (Oettinghaus et al., 2016) nebo aktinomycinem D (Große et al., 2016), při použití jiných látek (staurosporin, thapsigargin) inhibice Drp1 apoptózu neoddálila (Oettinghaus et al., 2016).

Drp1 ovlivňuje nejen Bax/Bak a MOMP, ale také přímo uvolňování cytochromu c. Cytochrom c se v IMS vyskytuje ve formě solubilní a vázané ke cardiolipinu. Aby se mohl cytochrom c uvolnit z mitochondrie při MOMP, musí být nejdříve uvolněn z interakce s IMM. Peroxidace cardiolipinu v IMM způsobená tvorbou volných radikálů komplexu dýchacího řetězce má za následek uvolnění veškerého cytochromu c do IMS a následně do cytoplazmy (Ott et al., 2002). Snížení hladiny Drp1 způsobí nižší míru peroxidace cardiolipinu, tudíž horší uvolňování cytochromu c z mitochondrie. Inhibice Drp1 má za následek také snížení množství krátkých isoformů OPA1, které jsou zodpovědné za remodelaci krist. Z toho důvodu dochází ke zpoždění výlevu cytochromu c, protože cristae junctions se bez Drp1 neotevírají (Otera et al., 2016).

Ačkoliv některé výsledky naznačují, že Drp1 je esenciální pro vnitřní apoptotickou kaskádu (Estaquier and Arnoult, 2007; Frank et al., 2001), bylo též potvrzeno, že apoptóza probíhá i při absenci tohoto proteinu, a to včetně fragmentace mitochondrií (Oettinghaus et al., 2016; Sheridan et al., 2008). Lze tedy říci, že role Drp1 při výlevu cytochromu c je komplexní, a bude do značné míry záviset na konkrétních okolnostech, zda je tento protein pro indukci apoptózy nezbytný či ne.

Výsledky se liší dle použité metodiky a závisí mimo jiné na způsobu inhibice Drp1 a indukce apoptózy. Možná se průběh aktivace výkonné apoptotické dráhy liší v závislosti na druhu apoptotického stimulu. Při použití UV ozáření výsledky ukazují, že Bax se váže do OMM v místě vazby Drp1 a Drp1 je tak nutný pro translokaci Bax do MOM a spuštění vnitřní apoptotické kaskády (Wang et al., 2015). Naopak Otera při použití aktinomycinu D ukazuje, že translokace Bax do OMM a MOMP jsou na Drp1 zcela nezávislé (Otera et al., 2016). Oettinghaus dostává rozdílné výsledky pro různé chemické látky (Oettinghaus et al., 2016).

Drp1 zřejmě není pro vnitřní apoptotickou dráhu za všech okolností esenciální, ačkoliv jeho vyřazení apoptózu zpomaluje či částečně inhibuje. V jaké fázi apoptózy a na jaký podnět se Drp1 váže do OMM stále není zcela jasné.

5.1.2 Dyn2 v apoptóze

Podobně jako deplece Drp1, tak i deplece Dyn2 způsobuje prodlevu ve fragmentaci mitochondrií následkem indukce apoptózy staurosporinem. Mitochondrie v buňkách po přidání staurosporinu tvořily prodlouženou mitochondriální síť, výlev cytochromu c byl pozdržen stejně tak jako vazba Bax na OMM (Lee et al., 2016).

5.1.3 Fis1 v apoptóze

Větší rezistenci vůči apoptóze než buňky s deplecí Drp1 mají buňky bez Fis1 (Lee et al., 2004). Fis1 je potřeba pro navázání Bax na mitochondrii. Působí tedy proapoptoticky. Jeho deplece způsobí inhibici aktivace apoptózy, zatímco jeho nadprodukce apoptózu dokáže spustit (James et al., 2003).

Fis1 také interaguje s membránovým proteinem endoplazmatického retikula Bap31 a tento komplex (pojmenovaný ARCosom) může aktivovat prokaspázu-8 a spustit tak apoptózu. Fis1 indukuje štěpení Bap31, čímž ho aktivuje. To způsobí výlev vápníkových kationtů z ER. Vylití Ca^{2+} do cytoplazmy detekuje mitochondrie, čímž dojde k přenosu apoptotického signálu z ER do mitochondrie a jeho amplifikaci. Při inhibici kaspáz a aktivaci ARCosomu nebyla pozorována fragmentace mitochondrií. Přestože se apoptotické signalizace účastní proteiny mitochondriální dynamiky, zdá se, že proces dělení mitochondrií je od spouštění apoptózy oddělen (Iwasawa et al., 2011). Pravděpodobně může být funkce Fis1 v indukci apoptózy nezávislá na jeho funkci v dělení mitochondrií.

5.1.4 MiD49/51 a Mff v apoptóze

Kristy mitochondrií v buňkách negativních na MiD49/51 po stimulaci apoptózy neprošly remodelací – nedošlo k jejich otevření. Naproti tomu buňky bez Mff se chovaly podobně jako nemutované buňky. Jejich kristy ztrácely lamelární tvar a otevíraly se do IMS. MiD51 tedy zřejmě propojuje Drp1 s proteiny zajišťujícími remodelaci krist v apoptóze (Otera et al., 2016).

5.2 Proteiny mitochondriální fúze v apoptóze

Overexprese Mfn1 oddaluje výlev cytochromu c pomocí zamezení N-koncové aktivace Bax (Ryu et al., 2012). Také overexprese Mfn2 inhibuje apoptózu díky kolokalizaci Mfn2 a Bax/Bak do klastrů během apoptózy (Karbowski et al., 2002).

Souvisle s fragmentací mitochondrií v apoptóze dochází k potlačení fúze. Funkce Mfn2 je závislá na solubilní frakci Bax a Bak. Při apoptóze se tyto dva proteiny lokalizují do OMM a nepodporují tak Mfn2 v jeho činnosti (Hoppins et al., 2011; Karbowski et al., 2006).

Ačkoliv mitochondrie se zvýšenou pro-fúzní aktivitou vykazující retikulární morfologii jsou více odolné vůči apoptotickým stimulům (Tondera et al., 2009), hyperfúzované mitochondrie mohou také způsobit apoptózu. Deplece Drp1 a Mff vede k inhibici dělení mitochondrií, které je potřeba pro dělení buněk. Dochází tak k zastavení buněčného cyklu a spuštění apoptózy závislé na kaspáze 8, která je primárně součástí vnější apoptotické dráhy (Westrate et al., 2014).

Naopak výrazné narušení fúze vede překvapivě ke snížení translokace Bax do OMM. Fragmentované mitochondrie podléhají MOMP méně než ty s normální morfologií. Pokud nedochází k fúzi, není skladba OMM v každé mitochondrii stejná a některé mitochondrie tak vážou Bax více než jiné, což může výrazně narušit dynamiku apoptózy (Weaver et al., 2014).

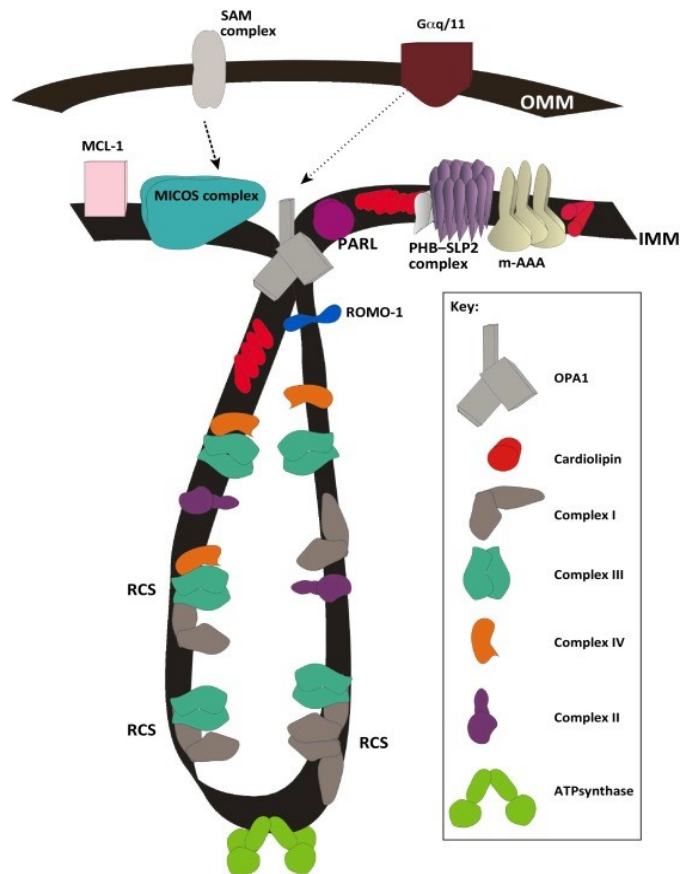
6 Remodelace krist

Kristy jsou struktury tvořené vnitřní mitochondriální membránou spojené s mezimembránovým prostorem jen úzkou tubulární strukturou (cristae junction). V kristách je lokalizovaná naprostá většina proteinů oxidativní fosforylace, tedy i cytochromu c, který je klíčovým hráčem v apoptóze (asi 85 % veškerého cyt c je v kristách). Pro uvolnění tohoto cyt c je zapotřebí kristy při apoptóze otevřít. Tento děj zahajuje tBID (BH3-only člen BCL-2 rodiny). Při solubilizaci vnější mitochondriální membrány digitoninem došlo k uvolnění jen asi 16 % celkového cytochromu c, zbylý zůstal uzavřený v kristách (Scorrano et al., 2002).

Remodelace krist se účastní celá skupina proteinů (Obr. 3), mimo jiné také MICOS (mitochondrial contact site and cristae-organizing system). Organizuje se do klastrů, tvořících pravidelný vzor v kristách vnitřní mitochondriální membrány. V nepřítomnosti MICOS nejsou kristy schopny udržet nativní strukturu a zhoršuje se funkce komplexů III a IV účastnících se oxidativní fosforylace. Jádrem komplexu jsou podjednotky Mic60, Mic19 a Mic10. Proteiny komplexu MICOS interagují s proteiny na vnitřní i vnější straně IMM. (Cogliati et al., 2016)

Hlavním protagonistou remodelace krist v apoptóze je Opa1. Opa1 uzavírá kristy a brání tak výlevu cytochromu c nezávisle na své funkci ve fúzi mitochondrií (Frezza et al., 2006). PARL (presenilin-associated rhomboid-like) proteáza štěpí lOPA1 na kratší mezimembránové isoformy, které společně s těmi dlouhými membránovými uzavírají cristae junctions (Cogliati et al., 2016). Mitochondrie buněk s vyřazeným genem pro PARL mnohem snadněji uvolňovaly cytochrom c do IMS při indukci apoptózy. PARL je tedy antiapoptotickým proteinem. PARL ale nemá vliv na funkci OPA1 jako profúzního proteinu. Při vyřazení PARL mitochondrie stále fúzovaly a vykazovaly normální morfologii (Cipolat et al., 2006).

Udržení správného poměru dlouhých a krátkých forem Opa1 je klíčové pro udržení tvaru mitochondrií. Při detekci apoptotického stimulu BH3-only proteiny prostřednictvím Bax a Bak, ale nezávisle na MOMP (Yamaguchi et al., 2008), aktivují Oma1 proteázu, která štěpí lOpa1 a dochází tak k otevírání krist a výlevu cytochromu c do IMS (Jiang et al., 2014). Ztráta Oma1 chrání buňku před



Obr.3 Remodelace krist je proces, kterého se účastní řada proteinů k tomu specializovaných, ale také proteiny mitochondriální dynamiky, Bcl-2 proteiny, proteiny oxidační fosforylace a membránové fosfolipidy (Cogliati et al., 2016).

apoptózou (Anand et al., 2014). Ačkoliv je štěpení Opa1 esenciální pro otevření krist, pro aktivaci apoptosomu stačí malé množství cytochromu c a remodelace krist tedy není pro apoptózu nutná. Nicméně ovlivňuje její kinetiku a také díky vlivu na respirační řetězec má mírná overexprese Opa1 protektivní účinky. Overexprese Opa1 mimo jiné způsobila pokles produkce ROS (Varanita et al., 2015).

Opa1 tedy působí antiapoptoticky. Jeho deplece vede k náchylnosti buněk k apoptóze (Olichon et al., 2006; Lee et al., 2004). Nicméně Sheridan et al. ukázali, že exprese Opa1 nejen nedokáže potlačit apoptózu, ale dokonce apoptózu spontánně vyvolává (Sheridan et al., 2008).

Provázání procesu remodelace krist s produkcí ROS (reaktivní formy kyslíku produkované elektron-transportním řetězcem) zajišťuje ROMO1 (ROS modulator 1). ROMO1 je protein vnitřní mitochondriální membrány, asociovaný s Opa1, který je potřebný pro udržení integrity krist. ROMO1 v oxidativním prostředí (při vyšší produkci ROS) oligomerizuje a tím je inaktivován. Vzhledem k tomu, že ROMO1 působí na Opa1, má pozitivní vliv nejen na udržení krist, ale také na fúzi mitochondrií. ROMO1 způsobuje oligomerizaci Opa1, která zajišťuje uzavřený tvar krist. Bez ROMO1 je narušená integrita cristaea junctions a mitochondrie je tak náchylnější k výlevu cytochromu c, tedy k apoptóze.

Zdá se, že právě ROMO1 je spojkou mezi nefunkčním elektrontransportním řetězcem a spuštěnou apoptózou (Norton et al., 2014).

Otera poukazuje na důležitost vazby Drp1 prostřednictvím MiD49/MiD51 do OMM pro remodelaci krist. Buňky bez genů pro MiD49/51 vykazovaly i po naštěpení lOpa1 na sOpa1 v rámci apoptotické kaskády lamelární tvar krist a byly chráněné proti vylití cytochromu c (Otera et al., 2016). To souhlasí s poznáním, že v buňkách bez Drp1 nedochází k výlevu cytochromu c (nebo dochází k jeho zpoždění) (Cassidy-Stone et al., 2008; Estaquier and Arnoult, 2007; Otera et al., 2016). Spojení Drp1 s remodelací krist je také významné v běžném fyziologickém dělení mitochondrií. Při zaškrcování membrán musí docházet také k remodelaci vnitřní struktury a vztah mechanismu zajišťujícího dělení mitochondrií s remodelací krist se zdá být logický (Otera et al., 2016).

7 Závěr

Ačkoliv je výzkum mitochondriální dynamiky často poněkud oddělen od studia biochemických drah, oxidativní fosforylace a buněčné smrti, rozhodně se jedná o témata, která jsou velmi úzce propojena. Tvar mitochondrií odráží, ale také může regulovat, jejich vitalitu a schopnost tvořit ATP. Ve stresu dochází k hyperfúzi mitochondrií a tím zvýšení jejich produktivity. Pokud ani toto opatření nezabrání poškození, vyše buňka signál k apoptóze. Bcl-2 proteiny zprostředkovávají informaci o poškození mitochondrií a zahajují sérii událostí, které vedou do bodu, kdy už buňka nemůže svou smrt zvrátit. Klíčovou fází je MOMP. Tvorba pórů je závislá na translokaci Bax do OMM, popř. aktivaci Bak, nicméně struktura samotného póru je otázkou diskuze. Bax je kolokalizován v OMM s proteiny mitochondriální dynamiky a vzhledem k tomu, že mitochondrie prochází v apoptóze masivní přestavbou, účast proteinů mitochondriální dynamiky na permeabilizaci membrány se přímo nabízí. Přesto převládá názor, že tvorba apoptotického póru ve vnější mitochondriální membráně je od mitochondriální fragmentace oddělena. Zda remodelace OMM usnadňuje tvorbu pórů nebo tvorba pórů indukuje dělení mitochondrií není zcela jasné. Samotná permeabilizace OMM je sice pro vykonání smrti dostačující, nicméně pro zvýšení efektivity uvolňování cytochromu c je zapotřebí otevření krist v IMM.

Pro hlubší pochopení fragmentace mitochondrií v apoptóze je nutno dívat se nejen jak proteiny mitochondriální dynamiky ovlivňují apoptotickou kaskádu, ale také jak proteiny apoptotické kaskády (Bcl-2 rodiny) regulují dynamiku mitochondrií. V apoptóze totiž dochází nejen k aktivaci dělení mitochondrií, ale také inhibici jejich fúze. Bax a Bid jsou zřejmě samy schopny modelovat membránu. Bcl-2 proteiny se dokonce účastní remodelace krist. Ačkoliv lze apoptotické děje a mitochondriální dynamiku experimentálně oddělit, jejich provázanost ve skutečném organismu je nepochybná a komplexní.

Popis studovaných dějů není kompletní, na mnoho otázek existují různé názory podložené experimenty, které je, díky rozdílům v metodice, těžké srovnávat. Většina poznatků na poli mitochondriální dynamiky a permeabilizace OMM je založena na studiu membránových modelových

systémů. Váček imitující mitochondriální membránu umožňuje pokusy s omezeným počtem proměnných, což přispívá ke snadnější interpretaci výsledků, avšak situace *in vivo* může být značně odlišná. Výsledky se také liší v závislosti na použitém způsobu indukce apoptózy a inhibice zkoumaných proteinů. Dále je nutné počítat s proměnlivostí popisovaných dějů mezi jednotlivými druhy tkání. Jak moc jsou tyto vlivy určující pro chování mitochondrií v apoptóze a jak dobře lze tedy porovnávat studie, které se liší použitými metodami, není známo.

Ať už se pro nějaký z navrhovaných scénářů rozhodneme či pracujeme s kombinacemi různých možností, lze získat alespoň přibližnou představu o tom, jak k těmto dějům dochází. Zcela přirozenou otázkou ale je „Proč?“.

Proč dochází k fragmentaci mitochondrií v apoptóze? Na modelu lipidových vesikulů bylo zjištěno, že Bax se váže do váček menších než 0,05 μm mnohem méně než do vesikulů mimikujících velikost běžné mitochondrie (zde 1 μm) (Renault et al., 2014). Hyperfragmentace mitochondrií při apoptotickém stimulu tedy může být mechanismem, jak eliminovat vazbu Bax do OMM a následnou permeabilizaci OMM. Dalo by se snad říci, že fragmentace mitochondrií je stresovou reakcí na apoptotický stimul – snaha buněčnou smrt ještě zvrátit. Při indukci apoptózy pomocí výlevu Ca^{2+} z ER byla pozorována nižší úmrtnost buněk se zvýšenou expresí Drp1. Fragmentace mitochondrií zřejmě způsobí, že některé části mitochondriálního retikula zůstanou od smrtelného přílivu vápníku uchráněny (Szabadkai et al., 2004). Tuto teorii podporuje názor, že k fragmentaci mitochondrií dochází ještě před MOMP (Montessuit et al., 2010; Wasiak et al., 2007). Nicméně jiní autoři podporují opačnou souslednost, tedy že dochází nejdříve k MOMP a fragmentace mitochondrií je až následkem apoptózy (Otera et al., 2016). Nižší translokaci Bax do OMM fragmentovaných mitochondrií zaznamenali také Weaver et al., kteří ale příčinu vidí v heterogenitě distribuce jednotlivých mitochondriálních membránových proteinů (Weaver et al., 2014). Věřím, že k rozdílné distribuci membránových proteinů dochází v buňkách s depletovanými Mfn1,2, ovšem pochybuji, že by akutní fragmentace mitochondrií mohla chránit buňku před apoptózou stejným způsobem. Pozorovanou reakcí na stres, který ale nevyvolal apoptózu je naopak hyperfúze mitochondrií (Tondera et al., 2009). Těžko si dokážu představit, že by ochranou proti stresu měly být dva zcela protichůdné mechanismy. Možná ale záleží na způsobu indukce buněčné smrti, buňka rozlišuje více scénářů a podle toho je schopna volit svou odpověď proti stresu.

Tvorba apoptotických tělísek vyžaduje segmentaci buněčného obsahu, a i mitochondriální retikulum je nutné rozdělit do vznikajících buněčných fragmentů. Rozpad mitochondrií by tak mohl být čistě projevem degradace. Analogicky i dělení buňky vyžaduje fragmentaci mitochondrií. Na druhou stranu při apoptóze již nezáleží, na rozdíl od buněčného dělení, na rovnoměrném rozdělení mitochondrií mezi vznikající segmenty. Pokud ale slouží fragmentace mitochondrií k lepší manipulaci při destrukci buňky, nedocházelo by analogicky také k fragmentaci dalších retikulárních organel, především endoplazmatického retikula? Bohužel, dynamika endoplazmatického retikula není příliš studovaná a

nepodařilo se mi dohledat, zda a za jakých okolností se ER fragmentuje v apoptóze podobně jako mitochondrie.

Nejjednodušší odpovědí je asi rezignace na hledání účelu a konstatování, že fragmentace mitochondrií je zkrátka následkem apoptotické kaskády. Drp1 je v apoptóze vázán do OMM ať již za účelem aktivace Bax, usnadnění tvorby pórů nebo remodelace krist. To jsou všechno děje pro vnitřní apoptotickou dráhu nutné. Navázání Drp1 na OMM proto může logicky vyústit v mitochondriální fragmentaci, i když pro iniciaci apoptózy tato fragmentace nemusí být rozhodující. Snížení cytosolického Bax také zastavuje fúzi. Následná fragmentace mitochondrií je tedy pouze epifenomémem apoptotické kaskády.

Závěrem lze říci, že vztah mitochondriální dynamiky a apoptózy je velmi komplexní, a k jejímu plnému pochopení bude třeba další výzkum. V tomto ohledu by bylo velice zajímavé, kdyby se na úrovni jednotlivých proteinů účastnících se mitochondriální dynamiky podařilo, např. pomocí cílené mutagenese, oddělit jejich roli v mitochondriální dynamice a v apoptóze. Toto by bylo obzvláště relevantní v případě Drp1 a jednoznačně by to ukázalo, zda apoptóza a mitochondriální fragmentace jsou kauzálně propojené.

8 Použitá literatura

Adachi, Y., Itoh, K., Yamada, T., Cervený, K.L., Suzuki, T.L., Macdonald, P., Frohman, M.A., Ramachandran, R., Iijima, M., and Sesaki, H. (2016). Coincident Phosphatidic Acid Interaction Restrains Drp1 in Mitochondrial Division. *Mol Cell* 63, 1034-1043.

Anand, R., Wai, T., Baker, M.J., Kladt, N., Schauss, A.C., Rugarli, E., and Langer, T. (2014). The i-AAA protease YME1L and OMA1 cleave OPA1 to balance mitochondrial fusion and fission. *The Journal of Cell Biology* 204, 919-929.

Berman, S.B., Chen, Y.-b., Qi, B., McCaffery, J.M., Rucker, E.B., Goebbels, S., Nave, K.-A., Arnold, B.A., Jonas, E.A., Pineda, F.J., *et al.* (2009). Bcl-xL increases mitochondrial fission, fusion, and biomass in neurons. *The Journal of Cell Biology* 184, 707-719.

Bleicken, S., Hofhaus, G., Ugarte-Urbe, B., Schröder, R., and García-Sáez, A.J. (2016). cBid, Bax and Bcl-xL exhibit opposite membrane remodeling activities. *Cell Death & Disease* 7, e2121.

Bratton, D.L., Fadok, V.A., Richter, D.A., Kailey, J.M., Guthrie, L.A., and Henson, P.M. (1997). Appearance of phosphatidylserine on apoptotic cells requires calcium-mediated nonspecific flip-flop and is enhanced by loss of the aminophospholipid translocase. *J Biol Chem* 272, 26159-26165.

Calabrese, C., Iommarini, L., Kurelac, I., Calvaruso, M.A., Capristo, M., Lollini, P.L., Nanni, P., Bergamini, C., Nicoletti, G., Giovanni, C.D., *et al.* (2013). Respiratory complex I is essential to induce a Warburg profile in mitochondria-defective tumor cells. *Cancer & metabolism* 1, 11.

Cassidy-Stone, A., Chipuk, J.E., Ingerman, E., Song, C., Yoo, C., Kuwana, T., Kurth, M.J., Shaw, J.T., Hinshaw, J.E., Green, D.R., *et al.* (2008). Chemical Inhibition of the Mitochondrial Division Dynamin Reveals Its Role in Bax/Bak-Dependent Mitochondrial Outer Membrane Permeabilization. *Developmental Cell* 14, 193-204.

Cereghetti, G.M., Costa, V., and Scorrano, L. (2010). Inhibition of Drp1-dependent mitochondrial fragmentation and apoptosis by a polypeptide antagonist of calcineurin. *Cell death and differentiation* 17, 1785-1794.

Cereghetti, G.M., Stangherlin, A., de Brito, O.M., Chang, C.R., Blackstone, C., Bernardi, P., and Scorrano, L. (2008). Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to

mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *105*, 15803-15808.

Cipolat, S., de Brito, O.M., Dal Zilio, B., and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *101*, 15927-15932.

Cipolat, S., Rudka, T., Hartmann, D., Costa, V., Serneels, L., Craessaerts, K., Metzger, K., Frezza, C., Annaert, W., D'Adamio, L., *et al.* (2006). Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling. *Cell* *126*, 163-175.

Claude, A., and Fullam, E.F. (1945). An Electron Microscope Study Of Isolated Mitochondria: Method and Preliminary Results. *The Journal of experimental medicine* *81*, 51-62.

* Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends in Biochemical Sciences* *41*, 261-273.

Cogliati, S., Frezza, C., Soriano, Maria E., Varanita, T., Quintana-Cabrera, R., Corrado, M., Cipolat, S., Costa, V., Casarin, A., Gomes, Ligia C., *et al.* (2013). Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency. *Cell* *155*, 160-171.

* Czabotar, P.E., Lessene, G., Strasser, A., and Adams, J.M. (2014). Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* *15*, 49-63.

Delettre, C., Griffoin, J.M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P., and Hamel, C.P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* *109*, 584-591.

Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J.-C., Westermann, B., Rugarli, E.I., and Langer, T. (2009). Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *The Journal of Cell Biology* *187*, 1023-1036.

Elgass, K.D., Smith, E.A., LeGros, M.A., Larabell, C.A., and Ryan, M.T. (2015). Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. *Journal of Cell Science* *128*, 2795-2804.

* Elmore, S. (2007). Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol* 35, 495-516.
Estaquier, J., and Arnoult, D. (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14, 1086-1094.

* Ferguson, S.M., and De Camilli, P. (2012). Dynamin, a membrane remodelling GTPase. *Nature reviews Molecular cell biology* 13, 75-88.

Frank, S., Gaume, B., Bergmann-Leitner, E.S., Leitner, W.W., Robert, E.G., Catez, F., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2001). The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1, 515-525.

* Frey, T.G., Renken, C.W., and Perkins, G.A. (2002). Insight into mitochondrial structure and function from electron tomography. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1555, 196-203.

Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G.V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R.S., Danial, N.N., De Strooper, B., *et al.* (2006). OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion. *Cell* 126, 177-189.

Friedman, J.R., Lackner, L.L., West, M., DiBenedetto, J.R., Nunnari, J., and Voeltz, G.K. (2011). ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science (New York, Ny)* 334, 358-362.

Gonzalez-Jamett, A.M., Haro-Acuna, V., Momboisse, F., Caviedes, P., Bevilacqua, J.A., and Cardenas, A.M. (2014). Dynamin-2 in nervous system disorders. *Journal of neurochemistry* 128, 210-223.

Große, L., Wurm, C.A., Brüser, C., Neumann, D., Jans, D.C., and Jakobs, S. (2016). Bax assembles into large ring-like structures remodeling the mitochondrial outer membrane in apoptosis. *The EMBO Journal* 35, 402-413.

Hinds, M.G., Smits, C., Fredericks-Short, R., Risk, J.M., Bailey, M., Huang, D.C.S., and Day, C.L. (2007). Bim, Bad and Bmf: intrinsically unstructured BH3-only proteins that undergo a localized conformational change upon binding to prosurvival Bcl-2 targets. *Cell Death Differ* 14, 128-136.

Hoppins, S., Edlich, F., Cleland, M.M., Banerjee, S., McCaffery, J.M., Youle, R.J., and Nunnari, J. (2011). The soluble form of Bax regulates mitochondrial fusion via MFN2 homotypic complexes. *Mol Cell* 41, 150-160.

Chang, K.-T., Anishkin, A., Patwardhan, G.A., Beverly, L.J., Siskind, L.J., and Colombini, M. (2015). Ceramide Channels: Destabilization by Bcl-xL and Role in Apoptosis(). *Biochimica et biophysica acta* 1848, 2374-2384.

Chappie, J.S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S.L., and Dyda, F. (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* 465, 435-440.

Chen, H., Detmer, S.A., Ewald, A.J., Griffin, E.E., Fraser, S.E., and Chan, D.C. (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160, 189-200.

Chen, H., Chomyn, A., and Chan, D.C. (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280, 26185-26192.

Chen, Y.-b., Aon, M.A., Hsu, Y.-T., Soane, L., Teng, X., McCaffery, J.M., Cheng, W.-C., Qi, B., Li, H., Alavian, K.N., *et al.* (2011). Bcl-xL regulates mitochondrial energetics by stabilizing the inner membrane potential. *The Journal of Cell Biology*.

Chipuk, Jerry E., McStay, Gavin P., Bharti, A., Kuwana, T., Clarke, Christopher J., Siskind, Leah J., Obeid, Lina M., and Green, Douglas R. (2012). Sphingolipid Metabolism Cooperates with BAK and BAX to Promote the Mitochondrial Pathway of Apoptosis. *Cell* 148, 988-1000.

Christenson, E., Merlin, S., Saito, M., and Schlesinger, P. (2008). Cholesterol Effects on Bax Pore Activation. *Journal of molecular biology* 381, 1168-1183.

Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T., and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *The EMBO Journal* 25, 2966-2977.

* Itoh, K., Nakamura, K., Iijima, M., and Sesaki, H. (2013). Mitochondrial Dynamics in Neurodegeneration. *Trends in cell biology* 23, 64-71.

Iwasawa, R., Mahul-Mellier, A.-L., Datler, C., Pazarentzos, E., and Grimm, S. (2011). Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *The EMBO Journal* 30, 556-568.

James, D.I., Parone, P.A., Mattenberger, Y., and Martinou, J.C. (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278, 36373-36379.

Jiang, X., Jiang, H., Shen, Z., and Wang, X. (2014). Activation of mitochondrial protease OMA1 by Bax and Bak promotes cytochrome c release during apoptosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111, 14782-14787.

Karbowski, M., Lee, Y.-J., Gaume, B., Jeong, S.-Y., Frank, S., Nechushtan, A., Santel, A., Fuller, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2002). Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, Drp1, and Mfn2 during apoptosis. *J Cell Biol* 159, 931-938.

Karbowski, M., Norris, K.L., Cleland, M.M., Jeong, S.Y., and Youle, R.J. (2006). Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443, 658-662.

Koshiba, T., Detmer, S.A., Kaiser, J.T., Chen, H., McCaffery, J.M., and Chan, D.C. (2004). Structural Basis of Mitochondrial Tethering by Mitofusin Complexes. *Science* 305, 858-862.

Kuwana, T., Bouchier-Hayes, L., Chipuk, J.E., Bonzon, C., Sullivan, B.A., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2005). BH3 domains of BH3-only proteins differentially regulate Bax-mediated mitochondrial membrane permeabilization both directly and indirectly. *Mol Cell* 17, 525-535.

Kuwana, T., Mackey, M.R., Perkins, G., Ellisman, M.H., Latterich, M., Schneider, R., Green, D.R., and Newmeyer, D.D. (2002). Bid, Bax, and Lipids Cooperate to Form Supramolecular Openings in the Outer Mitochondrial Membrane. *Cell* 111, 331-342.

Lee, J.E., Westrate, L.M., Wu, H., Page, C., and Voeltz, G.K. (2016). Multiple dynamin family members collaborate to drive mitochondrial division. *Nature* 540, 139-143.

Lee, Y.-j., Jeong, S.-Y., Karbowski, M., Smith, C.L., and Youle, R.J. (2004). Roles of the Mammalian Mitochondrial Fission and Fusion Mediators Fis1, Drp1, and Opa1 in Apoptosis. *Molecular Biology of the Cell* 15, 5001-5011.

Lewis, S.C., Uchiyama, L.F., and Nunnari, J. (2016). ER-mitochondria contacts couple mtDNA synthesis with mitochondrial division in human cells. *Science* 353.

Li, H., Zhu, H., Xu, C.J., and Yuan, J. (1998). Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis. *Cell* 94, 491-501.

- Liu, R., and Chan, D.C. (2015). The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1. *Molecular Biology of the Cell* 26, 4466-4477.
- Llambi, F., Moldoveanu, T., Tait, S.W.G., Bouchier-Hayes, L., Temirov, J., McCormick, L.L., Dillon, C.P., and Green, D.R. (2011). A unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol Cell* 44, 517-531.
- Losón, O.C., Song, Z., Chen, H., and Chan, D.C. (2013). Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Molecular Biology of the Cell* 24, 659-667.
- Malka, F., Guillery, O., Cifuentes-Diaz, C., Guillou, E., Belenguer, P., Lombès, A., and Rojo, M. (2005). Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Reports* 6, 853-859.
- Mancini, M., Anderson, B.O., Caldwell, E., Sedghinasab, M., Paty, P.B., and Hockenbery, D.M. (1997). Mitochondrial Proliferation and Paradoxical Membrane Depolarization during Terminal Differentiation and Apoptosis in a Human Colon Carcinoma Cell Line. *The Journal of Cell Biology* 138, 449-469.
- * Mishra, P., and Chan, D.C. (2014). Mitochondrial dynamics and inheritance during cell division, development and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 15, 634-646.
- Montessuit, S., Somasekharan, S.P., Terrones, O., Lucken-Ardjomande, S., Herzig, S., Schwarzenbacher, R., Manstein, D., Bossy-Wetzell, E., Basañez, G., Meda, P., *et al.* (2010). Membrane Remodeling Induced by the Dynamin Related Protein Drp1 Stimulates Bax Oligomerization. *Cell* 142, 889-901.
- Morciano, G., Giorgi, C., Balestra, D., Marchi, S., Perrone, D., Pinotti, M., and Pinton, P. (2016). Mcl-1 involvement in mitochondrial dynamics is associated with apoptotic cell death. *Molecular Biology of the Cell* 27, 20-34.
- Nakada, K., Inoue, K., Ono, T., Isobe, K., Ogura, A., Goto, Y.I., Nonaka, I., and Hayashi, J.I. (2001). Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. *Nature medicine* 7, 934-940.
- Naon, D., Zaninello, M., Giacomello, M., Varanita, T., Grespi, F., Lakshminaranayan, S., Serafini, A., Semenzato, M., Herkenne, S., Hernandez-Alvarez, M.I., *et al.* (2016). Critical reappraisal confirms

that Mitofusin 2 is an endoplasmic reticulum-mitochondria tether. *Proc Natl Acad Sci U S A* *113*, 11249-11254.

Norton, M., Ng, A.C.-H., Baird, S., Dumoulin, A., Shutt, T., Mah, N., Andrade-Navarro, M.A., McBride, H.M., and Scream, R.A. (2014). ROMO1 Is an Essential Redox-Dependent Regulator of Mitochondrial Dynamics. *Science Signaling* *7*, ra10-ra10.

Oettinghaus, B., D'Alonzo, D., Barbieri, E., Restelli, L.M., Savoia, C., Licci, M., Tolnay, M., Frank, S., and Scorrano, L. (2016). DRP1-dependent apoptotic mitochondrial fission occurs independently of BAX, BAK and APAF1 to amplify cell death by BID and oxidative stress. *Biochimica et biophysica acta* *1857*, 1267-1276.

Olichon, A., ElAchouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P., and Lenaers, G. (2006). OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* *14*, 682-692.

Otera, H., Miyata, N., Kuge, O., and Mihara, K. (2016). Drp1-dependent mitochondrial fission via MiD49/51 is essential for apoptotic cristae remodeling. *The Journal of Cell Biology* *212*, 531-544.

Otera, H., Wang, C., Cleland, M.M., Setoguchi, K., Yokota, S., Youle, R.J., and Mihara, K. (2010). Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* *191*, 1141-1158.

Ott, M., Robertson, J.D., Gogvadze, V., Zhivotovsky, B., and Orrenius, S. (2002). Cytochrome c release from mitochondria proceeds by a two-step process. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *99*, 1259-1263.

Palmer, C.S., Osellame, L.D., Laine, D., Koutsopoulos, O.S., Frazier, A.E., and Ryan, M.T. (2011). MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* *12*, 565-573.

Perciavalle, R.M., Stewart, D.P., Koss, B., Lynch, J., Milasta, S., Bathina, M., Temirov, J., Cleland, M.M., Pelletier, S., Schuetz, J.D., *et al.* (2012). Anti-Apoptotic MCL-1 Localizes to the Mitochondrial Matrix and Couples Mitochondrial Fusion to Respiration. *Nature Cell Biology* *14*, 575-583.

Perkins, G.A., Renken, C.W., Frey, T.G., and Ellisman, M.H. (2001). Membrane architecture of mitochondria in neurons of the central nervous system. *Journal of Neuroscience Research* *66*, 857-865.

Prudent, J., Zunino, R., Sugiura, A., Mattie, S., Shore, Gordon C., and McBride, Heidi M. (2015). MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death. *Molecular Cell* 59, 941-955.

Qian, W., Wang, J., Roginskaya, V., McDermott, L.A., Edwards, R.P., Stolz, D.B., Llambi, F., Green, D.R., and Houten, B.V. (2014). Novel combination of mitochondrial division inhibitor 1 (mdivi-1) and platinum agents produces synergistic pro-apoptotic effect in drug resistant tumor cells. *Oncotarget* 5, 4180-4194.

* Ravichandran, K.S. (2010). Find-me and eat-me signals in apoptotic cell clearance: progress and conundrums. *The Journal of experimental medicine* 207, 1807-1817.

Renault, Thibaud T., Floros, Konstantinos V., Elkholi, R., Corrigan, K.-A., Kushnareva, Y., Wieder, Shira Y., Lindtner, C., Serasinghe, Madhavika N., Ascioffa, James J., Buettner, C., *et al.* (2014). Mitochondrial Shape Governs BAX-Induced Membrane Permeabilization and Apoptosis. *Molecular Cell* 57, 69-82.

* Rowland, A.A., and Voeltz, G.K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13, 607-625.

Ryu, S.-W., Choi, K., Park, J.-H., Park, Y.-M., Kim, S., and Choi, C. (2012). Mitofusin 1 inhibits an apoptosis-associated amino-terminal conformational change in Bax, but not its mitochondrial translocation, in a GTPase-dependent manner. *Cancer Letters* 323, 62-68.

Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R.J., and Fuller, M.T. (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *Journal of Cell Science* 116, 2763-2774.

Scorrano, L., Ashiya, M., Buttle, K., Weiler, S., Oakes, S.A., Mannella, C.A., and Korsmeyer, S.J. (2002). A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2, 55-67.

Sheridan, C., Delivani, P., Cullen, S.P., and Martin, S.J. (2008). Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 31, 570-585.

Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D.L., and van der Bliek, A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12, 2245-2256.

Szabadkai, G., Simoni, A.M., Chami, M., Wieckowski, M.R., Youle, R.J., and Rizzuto, R. (2004). Drp-1-Dependent Division of the Mitochondrial Network Blocks Intraorganellar Ca²⁺ Waves and Protects against Ca²⁺-Mediated Apoptosis. *Molecular Cell* 16, 59-68.

Tondera, D., Grandemange, S., Jourdain, A., Karbowski, M., Mattenberger, Y., Herzig, S., Da Cruz, S., Clerc, P., Raschke, I., Merkwirth, C., *et al.* (2009). SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28, 1589-1600.

Varanita, T., Soriano, Maria E., Romanello, V., Zaglia, T., Quintana-Cabrera, R., Semenzato, M., Menabò, R., Costa, V., Civiletto, G., Pesce, P., *et al.* (2015). The Opa1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage. *Cell Metabolism* 21, 834-844.

Wang, J., Wang, P., Li, S., Wang, S., Li, Y., Liang, N., and Wang, M. (2014). Mdivi-1 Prevents Apoptosis Induced by Ischemia Reperfusion Injury in Primary Hippocampal Cells via Inhibition of Reactive Oxygen Species Activated Mitochondrial Pathway. *Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases* 23, 1491-1499.

Wang, P., Wang, P., Liu, B., Zhao, J., Pang, Q., Agrawal, S.G., Jia, L., and Liu, F.-T. (2015). Dynamin-related protein Drp1 is required for Bax translocation to mitochondria in response to irradiation-induced apoptosis. *Oncotarget* 6, 22598-22612.

Wasiak, S., Zunino, R., and McBride, H.M. (2007). Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *The Journal of Cell Biology* 177, 439.

Weaver, D., Eisner, V., Liu, X., Várnai, P., Hunyady, L., Gross, A., and Hajnóczky, G. (2014). Distribution and Apoptotic Function of Outer Membrane Proteins Depend on Mitochondrial Fusion. *Molecular Cell* 54, 870-878.

Westrate, L.M., Sayfie, A.D., Burgenske, D.M., and MacKeigan, J.P. (2014). Persistent Mitochondrial Hyperfusion Promotes G2/M Accumulation and Caspase-Dependent Cell Death. *PloS one* 9, e91911.

Yamaguchi, R., Lartigue, L., Perkins, G., Scott, R.T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M.H., and Newmeyer, D.D. (2008). Opa1-Mediated Cristae Opening Is Bax/Bak and BH3 Dependent, Required for Apoptosis, and Independent of Bak Oligomerization. *Molecular Cell* 31, 557-569.

* Youle, R.J., and Narendra, D.P. (2011). Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 12, 9-14.

* sekundární citace