

**Univerzita Karlova v Praze**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie  
Studijní obor: Biologie



**Michal Stoklasa**

**Mitochondrie anaerobních prvoků**  
Mitochondria of anaerobic protists

Bakalářská práce

Školitel: prof. RNDr. Jan Tachezy, Ph.D.

Praha, 2015

**Prohlášení:**

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

V Praze, 15.05.2015

Podpis

**Poděkování:**

Rád bych poděkoval svému školiteli prof. RNDr. Janu Tachezemu, Ph.D. a Mgr. Evě Nývltové za trpělivé zodpovídání mých dotazů a za jejich cenné rady a připomínky, díky kterým moje práce získala současnou podobu.

# Abstrakt

Mitochondrie jsou orgány endosymbiotického původu, tvořící energetické centrum eukaryotické buňky. Vzniká zde adenosintrifosfát (ATP), který je využíván jako zdroj energie pro většinu metabolických reakcí, probíhajících v buňce. Kromě toho se mitochondrie podílí na programované buněčné smrti (apoptóze) a probíhá zde  $\beta$ -oxidace mastných kyselin a syntéza Fe-S center, hemu a steroidů.

Při adaptaci na prostředí s nedostatkem kyslíku došlo u některých parazitických (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*) nebo volně žijících prvoků (*Sawyeria marylandensis*, *Mastigamoeba balamuthi*) k redukci většiny mitochondriálních funkcí. Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o těchto redukovaných mitochondriálních organelách anaerobních prvoků a popsat jejich konkrétní metabolismus.

**Klíčová slova:** mitochondrie, hydrogenosom, mitosom

# Abstract

Mitochondria are organelles of endosymbiotic origin, known as the energy center of every eukaryotic cell. Main function is the production of adenosin triphosphate (ATP), which is used as an energy source for most metabolic reactions occurring in the cell. Furthermore, mitochondria play significant role in apoptosis and we can find here a number of biochemical pathways such as  $\beta$ -oxidation of fatty acids, synthesis of iron-sulfur clusters, heme, steroids etc.

Most of the mitochondrial metabolic functions have been lost during the adaptation to oxygen-poor environment in some of the parasitic (*Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica*) or free-living protists (*Sawyeria marylandensis*, *Mastigamoeba balamuthi*). These organisms possess reduced mitochondrial organelles such as hydrogenosome or mitosome. The aim of this thesis is to summarize the information about these reduced mitochondrial organelles of anaerobic protists and to describe their specific metabolism.

**Key words:** mitochondrion, hydrogenosome, mitosome

# Obsah

1	Úvod .....	1
2	Evoluce mitochondriálních organel.....	2
3	Rozdělení mitochondriálních organel .....	6
3.1	Aerobní mitochondrie .....	6
3.2	Anaerobní mitochondrie .....	8
3.2.1	<i>Euglena gracilis</i> .....	8
3.2.2	<i>Chlamydomonas reinhardtii</i> .....	9
3.2.3	<i>Naegleria gruberi</i> .....	10
3.3	Vodík produkující mitochondrie .....	11
3.3.1	<i>Blastocystis hominis</i> .....	11
3.3.2	<i>Nyctotherus ovalis</i> .....	12
3.3.3	<i>Acanthamoeba castellanii</i> .....	13
3.3.4	<i>Pygmaia biforma</i> .....	14
3.3.5	<i>Orpinomyces</i> sp. kmen C1A .....	14
3.4	Hydrogenosom .....	16
3.4.1	<i>Trichomonas vaginalis</i> .....	17
3.4.2	<i>Piromyces</i> sp. 2 + <i>Neocallimastix frontalis</i> .....	18
3.4.3	<i>Spironucleus salmonicida</i> .....	19
3.4.4	<i>Sawyeria marylandensis</i> .....	19
3.4.5	<i>Mastigamoeba balamuthi</i> .....	19
3.5	Mitosom .....	21
3.5.1	<i>Entamoeba histolytica</i> .....	21
3.5.2	<i>Giardia intestinalis</i> .....	22
3.5.3	Mikrosporidie .....	23
3.5.4	<i>Cryptosporidium parvum</i> .....	24

4	Závěr .....	25
5	Rejstřík použitých zkratk .....	26
6	Citace .....	27

# 1 Úvod

Organely mitochondriálního typu byly dosud objeveny u všech studovaných eukaryot. Studium struktury buněk a později analýza mitochondriální DNA ukázala, že se mitochondrie vyvinuly z endosymbiotických bakterií (Margulis, 1996) a jejich společným předkem byla pravděpodobně  $\alpha$ -proteobakterie (Fitzpatrick et al., 2006; Gray, 1999). Důležitou událostí byl přenos genetické informace endosymbionta do jádra hostitele. Tímto procesem ztratil endosymbiont autonomii a postupně se přeměnil na buněčnou organelu. U té se vyvinul specializovaný systém, zajišťující transport proteinů kódovaných jádrem do organel. Proteiny určené k transportu do mitochondrie mají na N-konci krátkou specifickou adresovou sekvenci. Tato sekvence je po transportu proteinu do matrix organely odštěpena specifickou procesující peptidázou (Gakh et al., 2002).

Hlavní význam současných mitochondrií spočívá v syntéze ATP (adenosin trifosfátu), který slouží jako zdroj energie pro většinu metabolických reakcí, probíhajících v buňce. ATP vzniká pomocí ATP syntázy za využití protonového gradientu na vnitřní mitochondriální membráně. V mitochondrii se nachází také dráha biosyntézy hemu, Fe-S center či steroidů a  $\beta$ -oxidace mastných kyselin. Zároveň má mitochondrie významnou funkci při apoptóze (programované buněčné smrti), kdy je z mezimembránového prostoru do cytoplasmy transportována signální molekula cytochrom.

Během adaptace některých prvoků na život v prostředí chudém na kyslík u nich došlo k redukci značné části mitochondriálních funkcí, zejména Krebsova cyklu, dýchacího řetězce a genomu, proto jsou veškeré jejich proteiny kódovány jádrem, syntetizovány v cytoplasmě na volných ribozomech a dále importovány do organely.

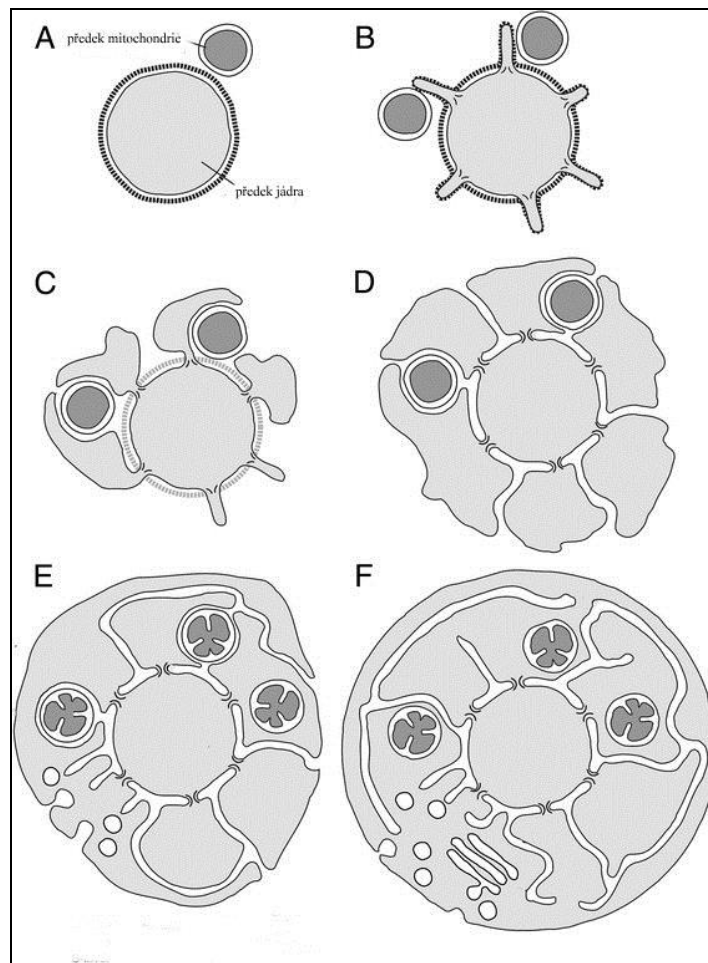
Všechny organely mitochondriálního typu jsou ohraničené dvojitou membránou a obsahují elektrondenzní granulózní matrix. Jedinou jejich společnou funkcí je tvorba FeS center pomocí mitochondriálního ISC (iron-sulfur cluster) systému (s výjimkou dvou archaméb *Entamoeba histolytica* a *Mastigamoeba balamuthi*). Eukaryota tento systém zdědila patrně po bakteriálním endosymbiontovi.

Cílem této bakalářské práce je shrnout poznatky o mitochondriálním metabolismu anaerobních prvoků a popsat rozdíly mezi jednotlivými typy mitochondriálních organel.

## 2 Evoluce mitochondriálních organel

První eukaryotické organismy se vyvinuly z prokaryot přibližně před 1,5-2 miliardami let (Knoll et al., 2006). Eukaryotická buňka se od prokaryotické odlišuje přítomností ohraničeného jádra, endomembránového transportního systému a semiautonomních buněčných organel, jako je mitochondrie nebo chloroplast. Mitochondriální organely byly na rozdíl od plastidů nalezeny u všech studovaných eukaryot, což značí, že endosymbióza hostitelské buňky a předka mitochondrie proběhla dříve než se objevily plastidy (Embley and Martin, 2006; Hjort et al., 2010). Srovnávací analýza mitochondriální DNA prokázala, že mitochondrie vznikly během jedinečné endosymbiotické události a jejich předkem byla  $\alpha$ -proteobakterie (Fitzpatrick et al., 2006; Gray, 1999; Rodríguez-Ezpeleta and Embley, 2012). Původní hostitelskou buňkou mohl být primitivní pra-eukaryot (Dyall et al., 2004). Poslední analýzy však ukazují, že jím byl spíše zástupce dnešních Archaea (Embley and Martin, 2006; Williams and Embley, 2014; Williams et al., 2013).

Vznik ohraničeného jádra, jako jednoho ze základních znaků eukaryotické buňky, byl dříve spojován s další endosymbiotickou událostí, kdy původní hostitelská buňka pohltila předka dnešního jádra (Lake and Rivera, 1994). Současné srovnávací studie archeálních a proteobakteriálních genomů tuto hypotézu nepodporují (Rochette et al., 2014). Novější studie navrhuje, že jádro vzniklo invaginací vnitřních membrán kolem chromatinu už u samotného prokaryotického prapředka (Cavalier-Smith, 2010). Nedávno byl navržen i model, podle kterého původcem jádra byla samotná hostitelská prokaryotní buňka, která se naučila tvořit výběžky cytoplasmatické membrány skrze svoji buněčnou stěnu (Baum and Baum, 2014). Pomocí těchto výběžků si vyměňovala živiny s ektosymbiotickou  $\alpha$ -proteobakterií, předchůdcem mitochondrie. Tyto stále se zvětšující výběžky následně proteobakterii obklopily a daly vzniknout cytoplasmě budoucí eukaryotické buňky, z mezer mezi výběžky se vytvořilo endoplasmatické retikulum a systém transportu váčků. Předek mitochondrie byl po obklopení uvězněn v endoplasmatickém retikulu, ze kterého se později dostal do cytoplasmy (viz. obr. 1) (Baum and Baum, 2014).



**Obrázek 1 - Inside out teorie vzniku jádra. A = předek jádra s buněčnou stěnou interagující s výrazně menší bakterií (předek mitochondrie), B = tvorba výběžků skrze buněčnou stěnu, C = ztráta hostitelské buněčné stěny, D = tvorba budoucích jaderných pórů, E = uzavření proto-mitochondrií uvnitř budoucího endoplasmatického retikula, F = přesun mitochondrie do cytoplasmy a vytvoření transportního systému váčků (převzato z Baum and Baum, 2014).**

V průběhu eukaryogeneze došlo k významné redukci genomu a metabolických drah původního endosymbionta, který se stal na hostiteli závislý (Gray, 1999; Kurland and Andersson, 2000). Velká část genů původního endosymbionta byla ztracena nebo přesunuta do jádra hostitelské buňky. V současné době se v mitochondrii syntetizuje méně než 1% potřebných proteinů. Většina mitochondriálních proteinů pochází z jádra a do organely je post-transkripčně importována mašinérií translokáz přítomných na vnější a vnitřní mitochondriální membráně (TOM a TIM komplexy) (Ferramosca and Zara, 2013; Truscott et al., 2003).

Původ mitochondrie popisuje řada hypotéz. Před objevem redukováných forem mitochondrií byla dlouho uznávána archezoální hypotéza o vzniku eukaryotické buňky. Ta předpokládala existenci primitivního eukaryota bez mitochondrií (Cavalier-Smith, 1989). Na

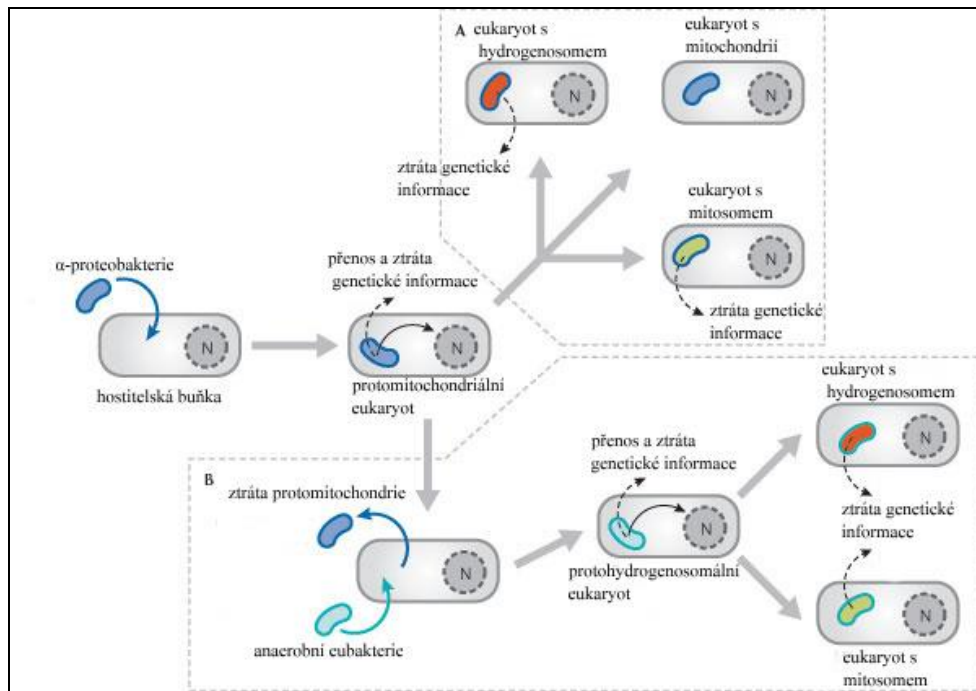
jejím základě byla v rámci systematického třídění organismů navržena říše Archezoa, kam byla zařazena současná jednobuněčná eukaryota (diplomonády, trichomonády, mikrosporídie a archaméby), u kterých nebyla mitochondrie objevena. Nepřítomnost mitochondrie byla považována za primitivní znak a tyto „amitochondriální“ organismy byly považovány za přímé potomky původních archezoí. Avšak identifikace genů mitochondriálního původu a objev redukovaných forem mitochondrií u původně "amitochondriálních" eukaryot zařadila tyto organismy mezi ostatní eukaryotické linie (Bui et al., 1996; Cavalier-Smith, 1993; Embley and Martin, 2006).

Primární funkce předka dnešní mitochondrie původně nespočívala v tvorbě ATP. Podle ox-tox hypotézy snižoval původní endosymbiont koncentraci kyslíku a chránil tak hostitelskou buňku před toxickými účinky kyslíkových radikálů (Andersson and Kurland, 1999). Až později získal endosymbiont také metabolické enzymy umožňující výrobu ATP.

Vodíková hypotéza předpokládá, že prapředek eukaryotické buňky byla anaerobní metanogenní archebakterie metabolicky závislá na vodíku, která pohltila fakultativně anaerobního heterotrofa (eubakterii) produkujícího potřebný vodík (Martin and Muller, 1998). Když vzniklá eukaryotická buňka zůstala v anaerobním prostředí, vznikl z endosymbionta hydrogenosom, pokud se dostala do prostředí aerobního, došlo k přeměně endosymbionta na mitochondrii (viz. obr. 2A). Hypotéza však nebyla podpořena fylogenetickou analýzou typických hydrogenosomálních enzymů, hydrogenázy a pyruvát:ferredoxin oxidoreduktázy (Horner et al., 2000).

Podle další syntrofické hypotézy produkovala hostitelská buňka metan a symbiontem byla anaerobní metanotrofní bakterie, která metan metabolicky využívala a stala se na hostitelské buňce závislá (Moreira and Lopez-Garcia, 1998). Původní hostitelská buňka byla už ale eukaryotického původu a mitochondrii neobsahovala (byla amitochondriální).

Další z hypotéz předpokládá, že některé buňky ztratily po endosymbiotické události své původní mitochondrie. Nicméně endosymbióza u nich proběhla podruhé a dala vznik jakýmsi protohydrogenosomům a ty poté získaly proteiny, které buňka dostala horizontálním genovým transferem při první endosymbióze (viz. obr. 2B) (Dyall et al., 2004). Tato hypotéza je ovšem závislá na několika aspektech: ztráta původního mitochondriálního endosymbionta musela proběhnout několikrát nezávisle na sobě u různých eukaryotických linií a hlavně by musely být objeveny sekundárně amitochondriální organismy, příbuzné těm s redukovanými mitochondriemi. Jelikož takový organismus objeven zatím nebyl, není tato teorie podložena žádným důkazem (Giezen and Tovar, 2005).



**Obrázek 2 - Teorie vzniku anaerobních mitochondrií; A = redukce mitochondrie, závislá na prostředí B = vznik druhou endosymbiotickou událostí (podle Giezen and Tovar, 2005).**

Kromě hypotéz zabývajících se důvodem a okolnostmi endosymbiotické události, existují i různé názory týkající se prostředí, ve kterém eukaryotická buňka vznikla. Hypotéza Canfieldova oceánu předpokládá, že ještě před 580 milióny let byl původní proceán anoxický (až na tenkou vrstvu u hladiny) a první eukaryotická buňka tak vznikla v prostředí bez kyslíku (Canfield et al., 2007). Podle této hypotézy měl tedy první eukaryot jednu z anaerobně fungujících mitochondrií.

Nejnovější zveřejněnou hypotézou o původu eukaryotické buňky je hypotéza pre-endosymbionta. Ačkoli je totiž mitochondriální DNA pozůstatkem genomu  $\alpha$ -proteobakterie, jen pouze 10-20% mitochondriálních proteinů má  $\alpha$ -proteobakteriální původ, zbytek jsou prokaryotické či eukaryotické homology (Gray, 2014). Grayova hypotéza předpokládá, že zbylých 80% proteinů bylo v buňce přítomných ve formě tzv. premitochondrie, organely, která už měla některé funkce dnešní mitochondrie jako například systém importu proteinů. Po endosymbióze došlo k fúzi  $\alpha$ -proteobakterie a premitochondrie a vznikla tak aerobní mitochondrie, jakou známe dnes. Tato teorie tedy nevysvětluje přímo původ mitochondrie, nýbrž pouze původ mitochondriálních proteinů, které nejsou  $\alpha$ -proteobakteriálními homology.

### 3 Rozdělení mitochondriálních organel

U eukaryot žijících v prostředí chudém na kyslík byly mitochondriální funkce do různé míry zredukovány. V závislosti na přítomnosti dýchacího řetězce, produkce vodíku, typu koncového elektronového akceptoru a schopnosti vyrábět ATP byly mitochondriální organely rozděleny do 5 tříd: klasická aerobní mitochondrie, anaerobní mitochondrie, vodík produkující mitochondrie, hydrogenosom a mitosom (Müller et al., 2012).

I přes více či méně redukováný energetický metabolismus mají všechny typy mitochondrií několik společných znaků: dvojitou membránu, syntézu Fe-S center (s výjimkou *E. histolytica*) a systém importu proteinů.

#### 3.1 Aerobní mitochondrie

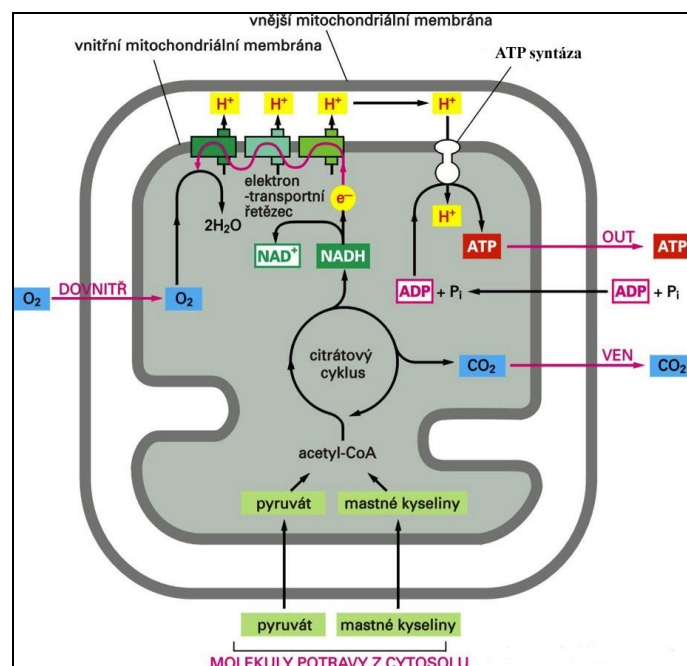
Aerobní mitochondrie je semiautonomní organela, která je přítomna u naprosté většiny eukaryotických organismů. Má dvě membrány rozdělující její vnitřní prostor na dvě části: mezimembránový prostor a matrix. Na membránách jsou lokalizovány translokázy vnější (TOM) a vnitřní (TIM) mitochondriální membrány, sloužící k transportu proteinů z cytoplasmy do mitochondrie. Vnitřní membrána tvoří tzv. krusty, výběžky zasahující do matrix, které několikanásobně zvětšují povrch membrány a tím umožňují přítomnost většího množství komplexů dýchacího řetězce.

Hlavním mitochondriálním substrátem je pyruvát. Ten vzniká glykolýzou v cytoplasmě a je dále transportován do matrix mitochondrie. Zde je pyruvát dehydrogenázou (PDH) dekarboxylován na acetyl-CoA, který vstupuje do Krebsova cyklu. V této metabolické dráze dochází k postupné dekarboxylaci a oxidaci kyseliny citrónové za vzniku oxidu uhličitého, vody a elektronů. Elektrony jsou dále přenášeny koenzymy NADH (nikotinamidadenin dinukleotid) a FADH<sub>2</sub> (flavinadenin dinukleotid) do dýchacího řetězce. Ten je tvořen čtyřmi proteinovými komplexy: komplexem I (NADH:ubichinon oxidoreduktáza), komplexem II (sukcinát:ubichinon oxidoreduktáza), komplexem III (ubichinol:cytochrom c oxidoreduktáza) a komplexem IV (cytochrom c oxidáza). Z redukováných koenzymů jsou elektrony přeneseny (pomocí ubichinonu a cytochromu c) na kyslík za vzniku vody. Protonové pumpy komplexů I, III a IV přenášejí protony přes vnitřní membránu do mezimembránového prostoru. Takto je generován protonový gradient, který

využívá komplex V ( $F_0F_1$ -ATP syntáza) pro syntézu ATP. Jako konečný akceptor elektronů je využíván kyslík díky velkému rozdílu redox potenciálu mezi donorem redukčních ekvivalentů (NADH) a soustavou kyslík-voda.

Společnou a důležitou funkcí všech mitochondrií je tvorba Fe-S center. Tyto centra jsou důležitou součástí řady mitochondriálních proteinů (NADH dehydrogenáza, pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, ferredoxin, hydrogenáza atd.) a komplexů I a II dýchacího řetězce a jejich hlavní funkcí je transport elektronů. Tvorba Fe-S center je u eukaryot zprostředkována pomocí proteinové kaskády, zvané ISC systém (iron-sulphur cluster). U eukaryot můžeme nalézt ještě dva další systémy schopné biogeneze Fe-S center v mitochondrii, NIF (nitrogen fixation system) a SUF (sulphur fixation system), tyto systémy jsou ale původně bakteriální a SUF systém je u eukaryot také typicky lokalizován v plastidech rostlin. Dále existuje výhradně cytosolický eukaryotní systém pro tvorbu Fe-S center, CIA (cytosolic iron-sulphur cluster assembly).

Aerobní mitochondrie je tedy hlavním energetickým centrem eukaryotické buňky, zároveň zde probíhají různé biochemické děje, například syntéza hemu (Ajioka et al., 2006; Heinemann et al., 2008), steroidů (Miller, 1995) a železo-sírných center (Lill et al., 1999) a metabolismus aminokyselin, případně lipidů.



Obrázek 3 – Metabolismus aerobní mitochondrie (převzato z <https://publi.cz/books/89/images/pics/158.jpg>).

## 3.2 Anaerobní mitochondrie

Anaerobní mitochondrie se od klasické aerobní liší zejména v koncovém elektronovém akceptoru, kterým není kyslík. Místo něj je využíván fumarát nebo sukcinát, které jsou vnitřně produkované, či nitrát (získávaný z vnějšího prostředí) (Risgaard-Petersen et al., 2006; Tielens et al., 2002; Buetow, 1989). Dalšími rozdíly jsou jiný přenašeč elektronů mezi komplexy dýchacího řetězce (rhodochinon místo ubichinonu) a jiné koncové produkty mitochondriálního metabolismu (propionát, sukcinát či acetát) (Müller et al., 2012).

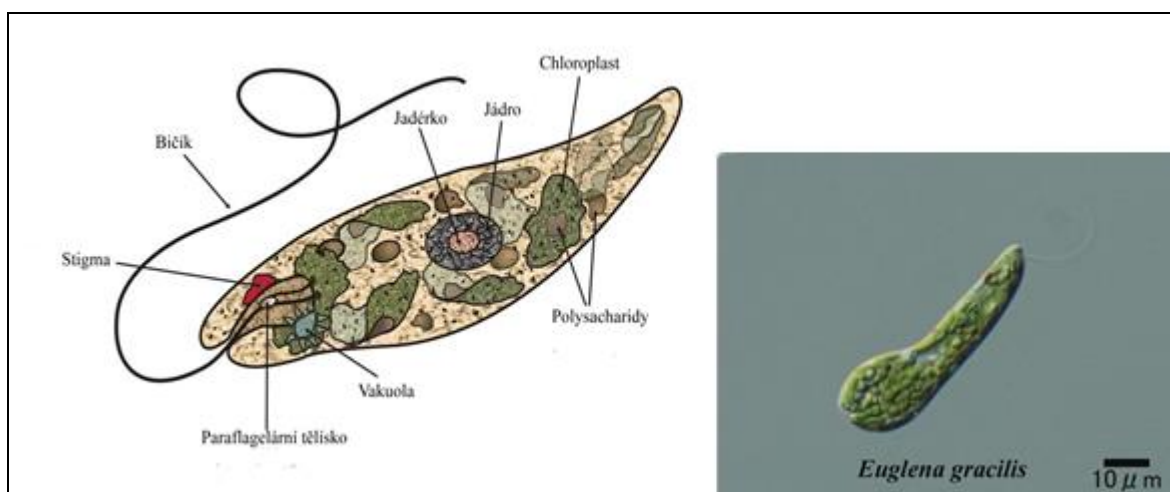
Anaerobní mitochondrie byla popsána zejména u parazitických helmintů a mořských kroužkoců. Překvapivě byla anaerobní forma mitochondrie také identifikována u aerobních protist *Euglena gracilis* (Hoffmeister et al., 2004) a *Chlamydomonas reinhardtii* (Cardol et al., 2005). V prostředí chudém na kyslík dochází k redukci jejich mitochondriálních funkcí a transformaci klasické mitochondrie na anaerobní.

### 3.2.1 *Euglena gracilis*

*Euglena gracilis* je jednobuněčný volně žijící bičíkatý prvek patřící do kmene Euglenozoa. Jelikož tento organismus obsahuje chloroplast (v tomto případě vzniklý sekundární endosymbiózou), je schopen získávat cukry jak autotrofně z CO<sub>2</sub> tak heterotrofně z organických látek. *Euglena* má specifickou organelu zvanou stigma, obsahující pigment karoten, která má spolu s paraflagelárním tělískem specifickou roli při orientovaném pohybu za světlem (viz. obr. 4) (Lebert and Hader, 1997; Ntefidou et al., 2003). Stigma je pravděpodobně odvozené z plastidu, stejně jako u řasy *Chlamydomonas* (Dieckmann, 2003).

Za aerobních podmínek využívá *Euglena* pro přeměnu pyruvátu na acetyl-CoA komplex pyruvát dehydrogenázy (PDH) a jako konečný elektronový akceptor zde slouží kyslík (Hoffmeister et al., 2004). V anaerobních podmínkách je využit jako konečný elektronový akceptor acetyl-CoA a výslednými produkty metabolismu jsou voskové monoestery (Inui et al., 1983). V tomto případě je pyruvát dekarboxylován na acetyl-CoA pomocí anaerobního enzymu pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktázy (PNO), která byla poprvé objevena právě u *Eugleny* (Inui et al., 1987). Zároveň při anaerobních podmínkách zajišťuje přenos elektronů u *E. gracilis* rhodochinon (v aerobním prostředí je jako přenašeč elektronů mezi komplexy dýchacího řetězce využíván ubichinon). Ten přenáší elektrony z komplexu I na

fumarát reduktázu, enzym redukující fumarát na sukcinát, který je dalšími enzymatickými reakcemi převeden až na voskové estery, konečné produkty anaerobního metabolismu Eugleny (Castro-Guerrero et al., 2005; Hoffmeister et al., 2004; Müller et al., 2012).



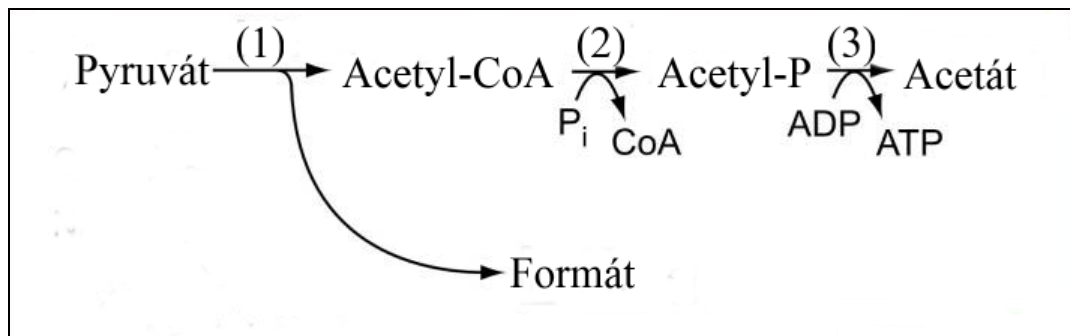
Obrázek 4 – Stavba buňky *E.gracilis* (převzato z [http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ea/Euglena\\_diagram.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ea/Euglena_diagram.jpg) a <http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0048.jpg>)

### 3.2.2 *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* je jednobuněčná řasa s dvěma bičíky patřící do kmene Chlorophyta, která obsahuje primární chloroplast. V aerobních podmínkách je pyruvát oxidativně dekarboxylován pomocí PDH, konečným elektronovým akceptorem je kyslík. ATP se generuje oxidativní fosforylací (Cardol et al., 2005).

V anaerobních podmínkách jsou konečnými produkty metabolismu acetát, formát, ethanol a vodík. Syntéza vodíku probíhá překvapivě v chloroplastu za pomoci PFO a hydrogenázy (van Lis et al., 2013). Právě produkce vodíku v anoxickém prostředí je spojena s možností využití této vlastnosti pro výrobu biopaliv (Radakovits et al., 2010).

V anaerobních podmínkách je pyruvát dekarboxylován v mitochondrii i chloroplastu pomocí pyruvát:formát lyázy (PFL), enzymu velmi citlivého na přítomnost kyslíku. Vedlejším produktem této reakce je formát. V anaerobním prostředí není řasa schopná využívat Krebsův cyklus ani dýchací řetězec. ATP je vyráběna pouze substrátovou fosforylací pomocí enzymu acetát kinázy za vzniku acetátu ( viz. obr. 5) (Müller et al., 2012; Mus et al., 2007).



Obrázek 5 – Syntéza acetátu v mitochondrii *C. reinhardtii* – 1 = pyruvát:formát lyáza, 2 = fosfotransacetyláza, 3 = acetát kináza (převzato z Müller et al., 2012).

### 3.2.3 *Naegleria gruberi*

Tento nepatogenní prvok žije převážně ve vodním prostředí či vlhké půdě. Specifickou morfológickou vlastností améb je možnost transformace améboidního stádia za nepříznivých podmínek do stádia bičíkovce (Lee, 2010). Ačkoli *N. gruberi* obývá hlavně prostředí bohaté na kyslík, analýza genomu ukázala přítomnost některých typických anaerobních enzymů (Fritz-Laylin et al., 2010). Za anaerobních podmínek by mohl být acetyl-CoA zpracováván na acetát pomocí ASCT (acetát:sukcinát CoA transferáza) či ACS (acetyl-CoA syntetáza). Oba tyto metabolické procesy vedou k produkci ATP (Fritz-Laylin et al., 2010). Zatím ale nebylo potvrzeno, zda jsou tyto enzymy v mitochondrii opravdu přítomné. V genomu byl nalezen také gen pro anaerobní enzym hydrogenázu a na základě přítomnosti mitochondriální importní sekvence byla hydrogenáza predikována do mitochondrie. Nejnovější výzkumy sice ukázaly, že *Naegleria* skutečně za aerobních podmínek vodík produkuje, aktivita hydrogenázy však byla nalezena pouze v cytosolu (Opperdoes et al., 2011; Tsaousis et al., 2014). Víme tedy, že mitochondrii *N. gruberi* nemůžeme zařadit mezi vodík produkující mitochondrii či hydrogenosom. Zároveň dosud nebyla úspěšná kultivace prvoka v anaerobních podmínkách a není tedy jasné, jestli zatím nebyly nalezeny optimální podmínky pro kultivaci nebo jeho mitochondrie vůbec nedokáže fungovat bez přístupu kyslíku (Tachezy, osobní sdělení).

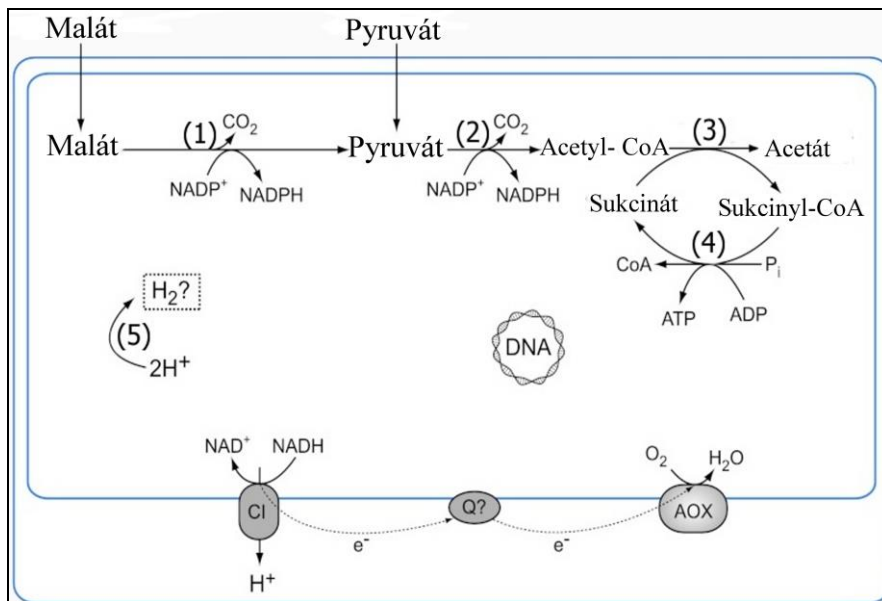
### 3.3 Vodík produkující mitochondrie

Tato organela kombinuje vlastnosti anaerobní mitochondrie a hydrogenosomu. Obsahuje vlastní genom a část dýchacího řetězce (komplex I, podílející se na tvorbě protonového gradientu, a komplex II) a navíc má anaerobní enzym hydrogenázu, která využívá jako terminální elektronový akceptor protony a produkuje vodík (Boxma et al., 2005). Organismy s touto mitochondrií obývají prostředí s nedostatkem kyslíku, jako je zažívací trakt obratlovců (*Blastocystis hominis*) (Stechmann et al., 2008) či bezobratlých (*Nyctotherus ovalis*) (Akhmanova et al., 1998).

#### 3.3.1 *Blastocystis hominis*

*B. hominis* je striktně anaerobní protist ze skupiny Stramenopila, parazitující v tlustém střevě člověka. Vytváří několik morfologicky odlišných forem (vakuolární, avakuolární, multivakuolární, granulární, améboidní a formu cysty), všechny ovšem obsahují mitochondriální organelu s tubulárními kristami (Tan, 2008; Zhang et al., 2012).

Mitochondriální genom kóduje proteiny komplexu I a II dýchacího řetězce, může tedy docházet k přenosu protonů přes membránu. Komplex III, IV a ATP syntáza nejsou přítomny (Denoeud et al., 2011; Makiuchi and Nozaki, 2014). Jako terminální elektronový akceptor může sloužit kyslík, ze kterého prostřednictvím alternativní oxidázy (AOX) vzniká voda (Stechmann et al., 2008). Pyruvát je v mitochondrii přetvářen na acetyl-CoA pomocí PNO (stejně jako u eugleny) (Lantsman et al., 2008). Ačkoli byly v genomu nalezeny i geny pro PDH, PFO, PFL a hydrogenázu, aktivita těchto enzymů nebyla prokázána (Denoeud et al., 2011; Lantsman et al., 2008; Stechmann et al., 2008; Tsalousis, osobní sdělení). Konečnými produkty metabolismu jsou laktát (vyráběný v cytoplasmě pomocí laktát dehydrogenázy) a acetát. Acetyl-CoA je metabolizován typicky hydrogenosomálními enzymy acetát:sukcinát CoA transferázou (ASCT) a sukcinyl-CoA syntetázou (SCS) na acetát a ATP (viz. obr. 6 a 7) (Stechmann et al., 2008).



Obrázek 6 – Metabolismus *B.hominis*; 1 = jablečný enzym, 2 = pyruvát:NADPH<sup>+</sup> oxidoreduktáza, 3 = acetát:sukcinát CoA-transferáza, 4 = sukcinyl-CoA syntetáza, 5 = hydrogenáza (převzato z Müller et. al., 2012).

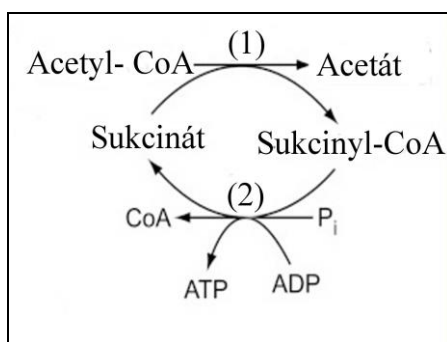
### 3.3.2 *Nyctotherus ovalis*

Mitochondriální organela nalezená u *Nyctotherus ovalis*, nálevníka žijícího ve střevě termitů a švábů, byla (stejně jako u *Blastocystis*) původně popsána jako hydrogenosom obsahující genom (Akhmanova et al., 1998). Jelikož ale byla prokázána přítomnost části respiračního řetězce, několika enzymů Krebsova cyklu a PDH komplexu, organela tohoto nálevníka byla později zařazena do kategorie vodík produkující mitochondrie (Müller et al., 2012). Vodík je produkován enzymem hydrogenázou, donorem elektronů je redukovaný koenzym NADH (vzniklý při přeměně pyruvátu na acetyl-CoA) (Boxma et al., 2005). Ve střevech žijí s nálevníkem v endosymbióze metanogenní archaea, která využívají vodík vyráběný prvokem jakožto substrát pro své metabolické reakce (Gijzen et al., 1991).

Pyruvát je v mitochondrii *Nyctotherus ovalis* dekarboxylován PDH komplexem a pomocí ACST a SCS je generováno ATP a vytváří se acetát (viz. obr. 7). Elektrony vzniklé aktivitou PDH komplexu jsou přeneseny koenzymem NADH na komplex I dýchacího řetězce. Odtud dále putují díky rhodochinonu na komplex II, kde jsou využity při přeměně fumarátu na sukcinát (Müller et al., 2012). Komplexy I a II pravděpodobně generují protonový gradient, ostatní tři komplexy dýchacího řetězce nebyly nalezeny (de Graaf et al., 2011).

V mitochondrii byly také identifikovány geny, kódující některé enzymy Krebsova cyklu, jako je fumaráza,  $\alpha$ -ketoglutarát dehydrogenáza či sukcinát dehydrogenáza (de Graaf et al., 2011; Müller et al., 2012). Cyklus tak funguje jen částečně a ve směru malát  $\rightarrow$  fumarát  $\rightarrow$  sukcinát. Mitochondrie *N. ovalis* obsahuje navíc také některé metabolické funkce aerobní mitochondrie, jako je metabolismus aminokyselin a mastných kyselin (de Graaf et al., 2011).

V cytosolu je pyruvát metabolizován na laktát a etanol pomocí LDH (laktát dehydrogenázy) a alkohol dehydrogenázy (Boxma et al., 2005).



Obrázek 7 – Substrátová fosforylace probíhající v anaerobních mitochondriích; 1 = acetát:sukcinát CoA-transferáza (ASCT), 2 = sukcinyl-CoA syntetáza (SCS) (převzato z Müller et. al., 2012).

### 3.3.3 *Acanthamoeba castellanii*

Mitochondrie této volně žijící améby obsahuje klasické metabolické cesty jako je Krebsův cyklus nebo dýchací řetězec (Gawryluk et al., 2012; Gawryluk et al., 2014). Za aerobních podmínek je překvapivě přítomná kromě PDH také PFO (která je velmi citlivá na kyslík). Analýza EST (expressed sequence tag – je založena na identifikaci krátkých genomových sekvencí cDNA) dále prokázala přítomnost hydrogenázy a ASCT (Gawryluk et al., 2014). Tyto enzymy jsou pravděpodobně využívány při dočasném pobytu v mikroaerofilním či anaerobním prostředí. Jejich biochemická aktivita nebyla v aerobních podmínkách detekována (Gawryluk et al., 2014).

### 3.3.4 *Pygsuia biforma*

Nedávno objevený prvok *P. biforma* patřící do skupiny Breviata, se v přírodě vyskytuje ve dvou formách: plovoucí stádium s dvěma dlouhými bičíky a stádium přisedlé, které má jeden z bičíků výrazně zkrácený a přiložený k tělu buňky (Brown et al., 2013).

Pyruvát je v mitochondrii zpracováván pomocí PFO, ATP vzniká substrátovou fosforylací. Konečným produktem metabolismu je acetát. Byla prokázána přítomnost části Krebsova cyklu, dvou podjednotek komplexu I a komplex II, který by mohl sloužit jako fumarát reduktáza. Jaký přenašeč elektronů mezi komplexy buňka využívá není jasné (Stairs et al., 2014). Zajímavá je nepřítomnost ISC systému tvorby Fe-S center. V genomu byly nalezeny dva proteiny systému SUF (sulphur fixation). Jeden z nich obsahuje N-koncovou sekvenci, adresující ho do mitochondrie, je tedy možné, že Fe-S centra by mohla být v mitochondrii vyráběna překvapivě systémem SUF (Stairs et al., 2014). Mitochondrie *P. biforma* na rozdíl od výše zmíněných organismů neobsahuje genom, kombinuje tak vlastnosti vodík produkující mitochondrie a hydrogenosomu (Maguire and Richards, 2014).

### 3.3.5 *Orpinomyces* sp. kmen C1A

Tato anaerobní houba z kmene Neocallimastigomycota obývá bachor a trávící trakt býložravců. Charakterizace mitochondriální organely u *Orpinomyces* je založena pouze na genomových a EST predikcích (Youssef et al., 2013). Pyruvát by mohl být v hydrogenosomu dekarboxylován enzymem PFL na formát a acetyl-CoA. ATP je generováno substrátovou fosforylací díky ASCT a SCS. V genomu byla potvrzena přítomnost hydrogenázy, dvou podjednotek komplexu I a v mitochondrii by mohl také fungovat komplex II (nejspíš jako fumarát reduktáza). Kromě těchto komplexů jsou v genomu přítomny i geny pro čtyři podjednotky ATP syntázy ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  a  $\delta$ ). Ta by teoreticky mohla transportovat vodíkové protony z matrix do cytoplasmy za spotřeby ATP, podílela by se tak na udržování zásaditého pH matrix (Youssef et al., 2013). V genomu byly navíc nalezeny skoro všechny geny pro proteiny komplexů TOM a TIM (Youssef et al., 2013). Bohužel žádná z předpovězených enzymatických aktivit zatím nebyla biochemicky potvrzena. Ačkoli Yousseff popisuje

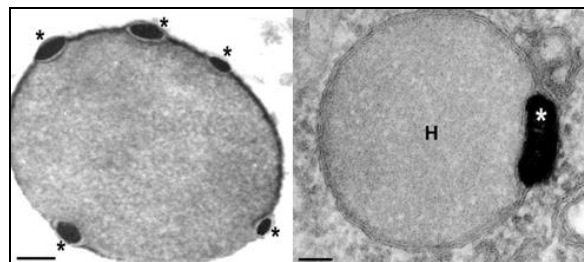
organelu jako hydrogenosom, na základě přítomnosti podjednotek ATP syntázy bych ji osobně spíše zařadil mezi vodík produkující mitochondrie.

### 3.4 Hydrogenosom

Hydrogenosomy na rozdíl od předchozích typů mitochondrií neobsahují DNA, elektron-transportní řetězec, Krebsův cyklus a nevykazují  $F_0-F_1$  ATPázovou aktivitu (Clemens and Johnson, 2000; Muller, 1993). Své jméno dostala organela podle schopnosti vyrábět molekulární vodík za pomoci anaerobního enzymu hydrogenázy (Lindmark and Müller, 1973). Jeho funkcí je přenos elektronů mezi aktivním místem enzymu a redoxními partnery, v tomto případě protonem (Vignais et al., 2001). Druhým klíčovým hydrogenosomálním enzymem je pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza (PFO), který dekarboxyluje pyruvát za vzniku  $CO_2$ , acetyl-CoA a redukovaného ferredoxinu (Raeburn and Rabinowitz, 1971). ATP vzniká dráhou "prodloužené glykolýzy" (katabolismus pyruvátu vedoucí ke vzniku ATP substrátovou fosforylací) enzymy ASCT a SCS (Muller, 1993). Systém proteinů katalyzujících biogenezi Fe-S center je homologní se systémem u klasické aerobní mitochondrie (Tachezy et al., 2001).

Vnitřní mitochondriální membrána netvoří krusty. U hydrogenosomů se také mohou vyskytovat mezimembránové váčky obsahující vápník (např. u *Trichomonas vaginalis*, viz. obr. 8) (Benchimol, 2009; Benchimol and De Souza, 1983).

Poprvé byla tato organela popsána v roce 1973 u parazita skotu *Tritrichomonas foetus* (Lindmark and Müller, 1973). Později byla objevena například u lidského patogena *Trichomonas vaginalis*, symbiotické chytridiomycety *Piromyces* či *Neocallimastix frontalis* nebo améb *Sawyeria marylandensis* a *Mastigamoeba balamuthii*. Jelikož byl hydrogenosom nalezen u takto evolučně vzdálených anaerobních protist, je pravděpodobné, že vznikly v průběhu evoluce několikrát nezávisle na sobě v důsledku adaptace na anoxické prostředí (Muller, 1993).



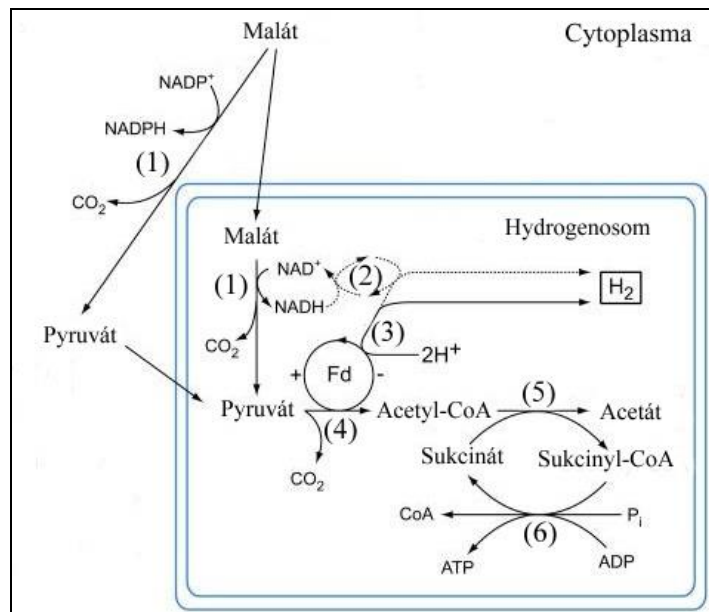
Obrázek 8 – Mezimembránové váčky v hydrogenosomu *T. vaginalis* (vlevo) a *T. foetus* (vpravo). Váčky jsou značené hvězdičkou, měřítko je dlouhé 50 nm (převzato z Benchimol, 2009).

### 3.4.1 *Trichomonas vaginalis*

Nejvíce zkoumané jsou hydrogenosomy parazitického prvoka *Trichomonas vaginalis*, který způsobuje onemocnění urogenitálního traktu u lidí. Do hydrogenosomu je z cytoplasmy kromě pyruvátu importován také malát, který je v organele pomocí enzymu malát dehydrogenázy (dekarboxylující, tzv. jablečný enzym) přeměněn na pyruvát. Uvolněné elektrony jsou při této reakci přijímány koenzymy  $\text{NAD}^+$ , případně  $\text{NADP}^+$  (Drmota et al., 1996). Pyruvát importovaný z cytoplasmy nebo vzniklý přímo v hydrogenosomu přeměnou malátu je oxidativně dekarboxylován pomocí PFO na acetyl-CoA a oxid uhličitý. Elektrony vzniklé během této reakce redukují  $[2\text{Fe}2\text{S}]$  ferredoxin (Müller et al., 2012). V hydrogenosomu *T. vaginalis* byly objeveny dva proteiny komplexu I dýchacího řetězce (homology NuoE a NuoF). Komplex I (NADH dehydrogenáza) v aerobní mitochondrii katalyzuje oxidaci NADH, v hydrogenosomu tyto dva proteiny slouží k přenosu elektronů z NADH na  $[2\text{Fe}2\text{S}]$  ferredoxin (viz. obr. 9) (Hrdy et al., 2004).

Konečnými produkty hydrogenosomálního metabolismu jsou acetát a vodík. Acetát a ATP jsou syntetizovány z acetyl-CoA pomocí enzymů ASCT a SCS (van Grinsven et al., 2008; Lahti et al., 1994). Klíčovým a charakteristickým enzymem hydrogenosomu je enzym hydrogenáza, která přijímá elektrony z redukovaného ferredoxinu a předává je na protony za současného vzniku plynného vodíku (Hrdy et al., 2004).

Velmi podobný metabolismus má příbuzný parazit skotu, *Tritrichomonas foetus*, u kterého byl hydrogenosom poprvé objeven (Lindmark and Müller, 1973). Rozdíly jsou pouze ve zpracování pyruvátu v cytoplasmě, kde je místo laktátu produkován etanol (Sutak et al., 2004; Sutak et al., 2012). Navíc je zde vyráběn sukcinát pomocí enzymu fumarát reduktázy (Müller et al., 2012).



Obrázek 9 – Metabolismus hydrogenosomu *T.vaginalis*; 1 = jablečný enzym 2 = dvě podjednotky komplexu I, 3 = hydrogenáza, 4 = pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza, 5 = acetát:sukcinát CoA-transferáza (ASCT), 6 = sukcinyl-CoA syntetáza (SCS), Fd = ferredoxin (převzato z Müller et. al., 2012).

### 3.4.2 *Piromyces sp. 2 + Neocallimastix frontalis*

Hydrogenosomy byly popsány i u dvou anaerobních hub z kmene Neocallimastigomycota. Překvapivě je u těchto organismů pyruvát v hydrogenosomu katabolizován enzymem pyruvát formát lyázou (PFL) na acetyl-CoA a formát (což je i konečný produkt metabolismu těchto hub) (Akhmanova et al., 1999; Boxma et al., 2004; Gelius-Dietrich and Henze, 2004). Během této reakce se neuvolňují žádné elektrony a nedochází tak k redukci ferredoxinu, potřebného pro funkci hydrogenázy. Byla navržena alternativní metabolická cesta, kdy potřebné elektrony získává ferredoxin z redukovaných koenzymů vzniklých dekarboxylací malátu (Boxma et al., 2004). Jelikož je ale přenos elektronů z NADH na ferredoxin energeticky nevýhodný, není produkce hydrogenosomálního vodíku příliš dobře prozkoumána. Acetyl-CoA je metabolisován pomocí enzymů ASCT a SCS za vzniku acetátu a ATP (Boxma et al., 2004).

Přítomnost typicky hydrogenosomálního enzymu PFO není u těchto hub jednoznačná. Aktivita PFO byla popsána u dvou zástupců rodu *Neocallimastix* (*N. patriciarum* a *N. sp. L2*) (Marvin-Sikkema et al., 1993; Yarlett et al., 1986), avšak nikoliv u *N. frontalis* a *Piromyces* (Akhmanova et al., 1999; Ofallon et al., 1991).

### **3.4.3 *Spironucleus salmonicida***

Tento střevní parazit ryb patří do řádu Diplomonadida. Typickým znakem diplomonád je přítomnost dvou jader, která jsou v buňce umístěna symetricky podle středové osy.

V genomu *S. salmonicida* bylo nalezeno pět genů pro enzym PFO a sedm genů pro hydrogenázu. Pomocí imunofluorescenční mikroskopie bylo prokázáno, že dvě kopie enzymu hydrogenázy a jedna kopie PFO jsou lokalizovány do hydrogenosomu tohoto prvoka, ostatní kopie jsou pravděpodobně přítomné v cytoplasmě. Buňka je tak nejspíš schopná vytvářet vodík v cytosolu i v mitochondrii. Vzniklý acetyl-CoA je metabolizován přímo na ATP a acetát pomocí enzymu ACS (Jerlstrom-Hultqvist et al., 2013).

### **3.4.4 *Sawyeria marylandensis***

*S. marylandensis* je mikroaerofilní améba ze třídy Heterolobosea, žijící v potocích bohatých na železo (O'Kelly et al., 2003). Některé její hydrogenosomy se morfologicky odlišují, obsahují totiž centrální dutinu (Barbera et al., 2010). Protože se dosud nepodařilo úspěšně kultivovat kulturu tohoto prvoka axenicky (tzn. bez kontaminace jinými organismy), jsou všechna dostupná data založena pouze na analýze EST. ATP je generováno substrátovou fosforylací pomocí enzymů ASCT a SCS. Mitochondriální metabolismus dále obsahuje PFO, hydrogenázu a pravděpodobně také některé podjednotky komplexu I dýchacího řetězce (podobně jako u *T. vaginalis*) (Barbera et al., 2010).

### **3.4.5 *Mastigamoeba balamuthi***

Volně žijící nepatogenní prvok *M. balamuthi* (dříve *Phreatamoeba balamuthi*) je schopný vytvářet tři různá stádia. Nejčastější formou je mnohojaderná améba, pohybující se pomocí panožek. Za určitých podmínek se améba transformuje do stádia bičíkovce, které ovšem není schopné reprodukce. Nepříznivé podmínky přežívá ve stádiu velmi odolné cysty (Chávez et al., 1986).

Mitochondriální organela byla objevena pomocí elektronové mikroskopie a původně byla považována za mitosom. Na základě analýzy EST byla v genomu prokázána přítomnost několika proteinů Krebsova cyklu, PFO, hydrogenázy a ACS. Metabolismus je tedy mnohem složitější než u nejbližší příbuzné parazitické améby *E. histolytica* (Gill et al., 2007). Stejně jako u *E. histolytica* byl ISC systém pro tvorbu Fe-S center nahrazen bakteriálním NIF systémem (viz. níže) (Gill et al., 2007). Ten je zde přítomen duplicitně jak v hydrogenosomu tak v cytoplasmě (Nývltová et al., 2013; Nývltová et. al., 2015).

## 3.5 Mitosom

Nejvíce redukována organela mitochondriálního typu byla pojmenována mitosom (Tovar et al., 1999) či kryptom (Mai et al., 1999). Mitosomy vůbec neprodukují ATP, které je syntetizováno výhradně v cytosolu. Pokud jsou přítomné typické hydrogenosomální enzymy jako PFO a hydrogenáza, můžeme je nalézt také pouze v cytoplasmě (Emelyanov and Goldberg, 2011). Stejně jako hydrogenosomy, také mitosomy neobsahují vlastní DNA a všechny mitosomální proteiny musí být do organely transportovány.

Mitosom byl poprvé popsán v roce 1999 na základě imunolokalizace chaperoninu Cpn 60 (typický mitochondriální protein, zajišťující správné složení ostatních proteinů, které jsou do mitochondrie importovány z cytoplasmy) u améby *Entamoeba histolytica*. (Mai et al., 1999; Tovar et al., 1999). Mitosom se dále vyskytuje například u mikrosporidií *Trachypleistophora hominis* (Williams et al., 2002) a *Encephalitozoon cuniculi* (Katinka et al., 2001), střevního parazita člověka *Giardia intestinalis* (Tovar et al., 2003) nebo u kokcidie *Cryptosporidium parvum* (LaGier et al., 2003; Riordan et al., 2003).

### 3.5.1 *Entamoeba histolytica*

Tato patogenní améba z říše Amoebozoa se vyskytuje ve dvou pohyblivých stádiích (tzv. trofozoitech). Forma minuta je stádiem neinvazní, v tlustém střevě člověka se živí bakteriemi a ve formě cyst může být vylučována stolicí. Za určitých podmínek se může změnit na formu magnu, která je invazivní a způsobuje měňavkovou úplavici a chronické infekce.

Mitosom byl poprvé objeven právě u *E. histolytica* díky lokalizaci typicky mitochondriálního proteinu Cpn60 (Mai et al., 1999; Tovar et al., 1999). Jelikož mitosom neprodukuje žádné ATP, je nutné energii pro funkci mitosomálních proteinů nebo proteinového importu dodávat z cytoplasmy (Tovar et al., 2007). K tomu slouží specifický ADP/ATP přenašeč, který pravděpodobně transportuje ATP do mitosomu (Chan et al., 2005).

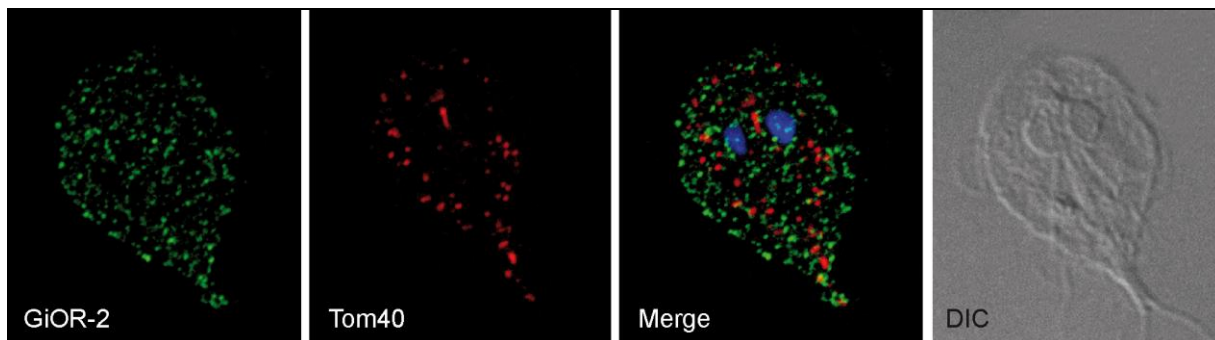
Mitochondriální ISC systém tvorby Fe-S center byl nahrazen neobvyklým bakteriálním systémem NIF, získaným horizontálním genovým přenosem z  $\epsilon$ -proteobakterie (Ali et al., 2004). Tento systém se pravděpodobně vyskytuje pouze v cytoplasmě (Dolezal et al., 2010; Mi-ichi et al., 2009; Nývltová et al., 2013), ačkoli dle práce Maralíkové je obsažen

také v mitosomu (Maralikova et al., 2010). Jedinou potvrzenou mitosomální funkcí u *E. histolytica* je tak systém aktivující sulfát (Mi-ichi et al., 2009), který se obvykle nachází v cytoplasmě nebo plastidech. Aktivování sulfátu ve formě 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát (PAPS) je důležité pro jeho následné zabudování do biomolekul jako je cystein či methionin nebo může být využit pro tvorbu sulfolipidů, jejichž funkce v buňce ovšem zatím není známa. Zároveň byl potvrzen vliv sulfátu na buněčný růst a proliferaci (množení buněk) u *E. histolytica* (Mi-ichi et al., 2011).

### **3.5.2 *Giardia intestinalis***

Tento parazitický bičíkovec, patřící do řádu Diplomonadida, má na ventrální straně těla přísavný disk, díky kterému je schopný se přichytit na epitel tenkého střeva. Takto zabraňuje zpětné resorbci vody a způsobuje tak u člověka průjmová onemocnění.

Mitosomy *G. intestinalis* rozdělujeme na dva typy na základě lokalizace v buňce. Centrální mitosomy se typicky vyskytují mezi dvěma jádry prvoka (viz. obr. 10) a tzv. periferní mitosomy můžeme nalézt rozmístěné různě v cytoplasmě, hlavně ale v kaudální části tohoto prvoka. V roce 2001 byla v *G. intestinalis* prokázána přítomnost genu pro IscS (enzym cystein desulfuráza), který dodává sulfát pro FeS centrum. Později byla pomocí imunofluorescenční mikroskopie potvrzena jeho lokalizace do mitosomů (Dolezal et al., 2005; Tovar et al., 2003). ISC systém zajišťuje skládání Fe-S center, což je také jediná potvrzená funkce této organely. V mitosomu byla experimentálně potvrzena přítomnost dvaceti proteinů, včetně ferredoxinu a chaperoninu Hsp70 (Jedelský et al., 2011; Smíd et al., 2008). Zatím však není jasné, jakým způsobem se do mitosomu dostává ATP pro správné fungování chaperoninu, který je zodpovědný za finální přenos Fe-S centra na cílový protein.



**Obrázek 10 – Imunofluorescenční lokalizace proteinu diflavinu (zeleně značený) v buňce *G. intestinalis*. Červeně je značen mitochondriální marker Tom40, který je schopný přenášet proteiny přes vnější mitochondriální membránu. Modře obarvená jsou jádra. Mezi jádry můžeme vidět uspořádané centrální mitosomy. DIC = differential interference contrast (převzato z Jedelský et. al., 2011).**

### 3.5.3 Mikrosporidie

Ačkoli byli tito vnitrobuněční parazité dlouho považováni za amitochondriální eukaryota, také u nich byl objeven a popsán mitosom. Na základě genomové analýzy byly u mikrosporidie *Encephalitozoon cuniculi* objeveny geny pro proteiny účastnící se biogeneze Fe-S center (IscS, IscU, ferredoxin a ferredoxin NADPH oxidoreduktáza) (Katinka et al., 2001). Pomocí imunofluorescenční kolokalizace s mitochondriálním proteinem Hsp70 byla v mitosomu *E. cuniculi* prokázána přítomnost IscS, IscU a frataxinu (donor železa pro Fe-S centrum) (Goldberg et al., 2008). I zde tedy mitosom pravděpodobně slouží k tvorbě Fe-S center. *E. cuniculi* získává ATP převážně z hostitelské buňky. Na buněčné membráně této mikrosporidie byly objeveny tři ADP/ATP přenašeče, čtvrtý byl lokalizován v mitosomu a slouží k přenosu ATP z cytosolu do mitochondriální organely.

U další studované mikrosporidie *Trachipleistophora hominis* byla v mitosomu na základně imunolokalizace potvrzena přítomnost chaperoninu Hsp70 a proteinu IscS (Goldberg et al., 2008; Williams et al., 2002). Proteiny IscU a frataxin byly překvapivě nalezeny pouze v cytoplasmě. Jakým způsobem dochází k výrobě Fe-S center u *T. hominis* tak není příliš jasné (Goldberg et al., 2008).

### 3.5.4 *Cryptosporidium parvum*

Kokcidie *C. parvum* je intracelulární parazit patřící do kmene Apicomplexa, který způsobuje akutní průjem u hospodářských zvířat i u člověka.

Veškeré dráhy energetického metabolismu jsou přítomné pouze v cytosolu. Pyruvát je dekarboxylován enzymem PNO na acetyl-CoA a ATP vzniká pomocí enzymu ACS. (Mogi and Kita, 2010). V roce 2003 byla v mitochondriálních organelách pomocí imunofluorescence prokázána přítomnost typicky mitochondriálních proteinů Hsp70, Cpn60 a zároveň proteinů ISC systému (IscS a IcsU) (LaGier et al., 2003; Riordan et al., 2003).

U blízkého příbuzného *Cryptosporidium muris* je acetyl-CoA také vyráběn z pyruvátu pomocí PNO (Mogi and Kita, 2010). Na základě genomové analýzy byly ale u tohoto prvoka identifikovány všechny enzymy Krebsova cyklu a ATP syntáza. Kromě substrátové fosforylace enzymem ACS by tak mohlo být ATP vyráběno také klasickou oxidativní fosforylací (Mogi and Kita, 2010). Zatím nebylo prokázáno zda mitochondrie obsahuje vlastní genom. Navíc není žádný z předpokládaných enzymatických dějů v mitochondrii tohoto prvoka podložen biochemicky. Je ale velmi pravděpodobné, že mitochondrie *C. muris* bude po dalším zkoumání zařazena mezi aerobní či anaerobní mitochondrie.

## 4 Závěr

Adaptace některých anaerobních prvoků na prostředí s nedostatkem kyslíku je spojena s redukcí typických mitochondriálních funkcí. Během této redukce dochází zejména ke ztrátě komponent dýchacího řetězce, enzymů Krebsova cyklu a mitochondriálního genomu. Typická syntéza energie ve formě ATP prostřednictvím oxidativní fosforylace je nahrazena substrátovou fosforylací. Redukované mitochondrie některých prvoků rovněž získaly netypické metabolické cesty jako je systém aktivující sulfát u *E. histolytica*. Dalším příkladem je nahrazení klasické mitochondriální ICS dráhy pro skládání Fe-S center bakteriálním NIF systémem jako u *M. balamuthii*. Dráha syntézy Fe-S center může být také úplně redukována, jako je tomu u *E. histolytica*.

Jako základní substrát pro všechny metabolické reakce v mitochondriálních organelách je využíván pyruvát. Ten může být dále metabolizován nejenom klasickým mitochondriálním PDH komplexem, ale i dalšími enzymy citlivými na kyslík, jako jsou PFL, PFO nebo PNO. Kromě toho mají některé mitochondriální organely schopnost produkovat vodík pomocí bakteriálního enzymu hydrogenázy.

Většina redukovaných mitochondrií byla identifikována u parazitických prvoků, je tedy velmi obtížné odlišit, zda jsou adaptace mitochondriálního metabolismu spojené s přechodem organismu na parazitický způsob života nebo na život v anaerobním prostředí. Velmi důležitý je proto také výzkum volně žijících prvoků, jako *M. balamuthii* a *S. marylandensis*, který by mohl redukcii mitochondriálních organel více objasnit. Je ovšem možné, že nikdy opravdu nezjistíme, jakým způsobem mitochondriální organela vznikla a jak se v průběhu stovek miliónů let evolučně vyvíjela.

## 5 Rejstřík použitých zkratek

ACS = acetyl CoA syntetáza

AOX = alternativní oxidáza

ASCT = acetát:sukcinát CoA transferáza

ATP = adenosintrifosfát

CIA = cytosolic iron-sulphur cluster assembly systém

FADH<sub>2</sub> = flavinadenindinukleotid

ISC = iron-sulphur cluster systém

LDH = laktát dehydrogenáza

NADH = nikotinamidadenindinukleotid

NIF = nitrogen fixation systém

PAPS = 3-fosfoadenosin-5-fosfosulfát

PDH = pyruvát dehydrogenáza

PFL = pyruvát:formát lyáza

PFO = pyruvát:ferredoxin oxidoreduktáza

PNO = pyruvát:NADP<sup>+</sup> oxidoreduktáza

SCS= sukcinyl-CoA syntetáza

SUF = sulphur fixation system

## 6 Citace

- Ajioka, R.S., Phillips, J.D., and Kushner, J.P. (2006). Biosynthesis of heme in mammals. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1763, 723–736.
- Akhmanova, A., Voncken, F., van Alen, T., van Hoek, A., Boxma, B., Vogels, G., Veenhuis, M., and Hackstein, J.H. (1998). A hydrogenosome with a genome. *Nature* 396, 527–528.
- Akhmanova, A., Voncken, F.G., Hosea, K.M., Harhangi, H., Keltjens, J.T., op den Camp, H.J., Vogels, G.D., and Hackstein, J.H. (1999). A hydrogenosome with pyruvate formate-lyase: anaerobic chytrid fungi use an alternative route for pyruvate catabolism. *Molecular Microbiology* 32, 1103–1114.
- Ali, V., Shigeta, Y., Tokumoto, U., Takahashi, Y., and Nozaki, T. (2004). An intestinal parasitic protist, *Entamoeba histolytica*, possesses a non-redundant nitrogen fixation-like system for iron-sulfur cluster assembly under anaerobic conditions. *The Journal of biological chemistry* 279, 16863–16874.
- Andersson, S.G.E., and Kurland, C.G. (1999). Origins of mitochondria and hydrogenosomes. *Current Opinion in Microbiology* 2, 535–541.
- Barbera, M.J., Ruiz-Trillo, I., Tufts, J.Y.A., Bery, A., Silberman, J.D., and Roger, A.J. (2010). *Sawyeria marylandensis* (Heterolobosea) Has a Hydrogenosome with Novel Metabolic Properties. *Eukaryotic Cell* 9, 1913–1924.
- Baum, D.A., and Baum, B. (2014). An inside-out origin for the eukaryotic cell. *BMC Biology* 12, 76.
- Benchimol, M. (2009). Hydrogenosomes under microscopy. *Tissue Cell* 41, 151–168.
- Benchimol, M., and De Souza, W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *The Journal of Protozoology* 30, 422–425.
- Boxma, B., Voncken, F., Jannink, S., van Alen, T., Akhmanova, A., van Weelden, S.W.H., van Hellemond, J.J., Ricard, G., Huynen, M., Tielens, A.G.M., et al. (2004). The anaerobic chytridiomycete fungus *Piromyces* sp. E2 produces ethanol via pyruvate:formate lyase and an alcohol dehydrogenase E. *Molecular Microbiology* 51, 1389–1399.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W.M., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J.H., van Hellemond, J.J., et al. (2005). An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature* 434, 74–79.
- Brown, M.W., Sharpe, S.C., Silberman, J.D., Heiss, A.A., Lang, B.F., Simpson, A.G.B., and Roger, A.J. (2013). Phylogenomics demonstrates that breviate flagellates are related to opisthokonts and apusomonads. *Proceedings of the Royal Society B: Biological sciences* 280, 20131755.
- Bui, E.T., Bradley, P.J., and Johnson, P.J. (1996). A common evolutionary origin for mitochondria and hydrogenosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93, 9651–9656.
- Canfield, D.E., Poulton, S.W., and Narbonne, G.M. (2007). Late-Neoproterozoic deep-ocean oxygenation and the rise of animal life. *Science* 315, 92–95.

- Cardol, P., Gonzalez-Halphen, D., Reyes-Prieto, A., Baurain, D., Matagne, R.F., and Remacle, C. (2005). The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the genome sequencing project. *Plant Physiology* *137*, 447–459.
- Castro-Guerrero, N.A., Jasso-Chávez, R., and Moreno-Sánchez, R. (2005). Physiological role of rhodoquinone in *Euglena gracilis* mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta* *1710*, 113–121.
- Cavalier-Smith, T. (1989). Molecular phylogeny. Archaeobacteria and Archezoa. *Nature* *339*, 100–101.
- Cavalier-Smith, T. (1993). Kingdom protozoa and its 18 phyla. *Microbiology Reviews* *57*, 953–994.
- Cavalier-Smith, T. (2010). Origin of the cell nucleus, mitosis and sex: roles of intracellular coevolution. *Biology Direct* *5*, 7.
- Chan, K.W., Slotboom, D.-J., Cox, S., Embley, T.M., Fabre, O., van der Giezen, M., Harding, M., Horner, D.S., Kunji, E.R.S., León-Avila, G., et al. (2005). A novel ADP/ATP transporter in the mitosome of the microaerophilic human parasite *Entamoeba histolytica*. *Current Biology* *15*, 737–742.
- Chávez, L.A., Balamuth, W., and Gong, T. (1986). A light and electron microscopical study of a new, polymorphic free-living amoeba, *Phreatamoeba balamuthi* n. g., n. sp. *The journal of protozoology* *33*, 397–404.
- Clemens, D.L., and Johnson, P.J. (2000). Failure to detect DNA in hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis* by nick translation and immunomicroscopy. *Molecular and Biochemical Parasitology* *106*, 307–313.
- Denoeud, F., Roussel, M., Noel, B., Wawrzyniak, I., Silva, C.D., Diogon, M., Viscogliosi, E., Brochier-Armanet, C., Couloux, A., Poulain, J., et al. (2011). Genome sequence of the stramenopile *Blastocystis*, a human anaerobic parasite. *Genome Biology* *12*, R29.
- Dieckmann, C.L. (2003). Eyespot placement and assembly in the green alga *Chlamydomonas*. *BioEssays* *25*, 410–416.
- Dolezal, P., Smíd, O., Rada, P., Zubáčová, Z., Bursać, D., Suták, R., Nebesárová, J., Lithgow, T., and Tachezy, J. (2005). *Giardia* mitosomes and trichomonad hydrogenosomes share a common mode of protein targeting. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *102*, 10924–10929.
- Dolezal, P., Dagley, M.J., Kono, M., Wolyneć, P., Likić, V.A., Foo, J.H., Sedinová, M., Tachezy, J., Bachmann, A., Bruchhaus, I., et al. (2010). The essentials of protein import in the degenerate mitochondrion of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Pathogens* *6*, e1000812.
- Drmotá, T., Proost, P., Van Ranst, M., Weyda, F., Kulda, J., and Tachezy, J. (1996). Iron-ascorbate cleavable malic enzyme from hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: purification and characterization. *Molecular and Biochemical Parasitology* *83*, 221–234.
- Dyall, S.D., Brown, M.T., and Johnson, P.J. (2004). Ancient Invasions: From Endosymbionts to Organelles. *Science* *304*, 253–257.
- Embley, T.M., and Martin, W. (2006). Eukaryotic evolution, changes and challenges. *Nature* *440*, 623–630.

- Emelyanov, V.V., and Goldberg, A.V. (2011). Fermentation enzymes of *Giardia intestinalis*, pyruvate:ferredoxin oxidoreductase and hydrogenase, do not localize to its mitosomes. *Microbiology-SGM* 157, 1602–1611.
- Ferramosca, A., and Zara, V. (2013). Biogenesis of mitochondrial carrier proteins: Molecular mechanisms of import into mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1833, 494–502.
- Fitzpatrick, D.A., Creevey, C.J., and McInerney, J.O. (2006). Genome phylogenies indicate a meaningful alpha-proteobacterial phylogeny and support a grouping of the mitochondria with the Rickettsiales. *Molecular Biology and Evolution* 23, 74–85.
- Fritz-Laylin, L.K., Prochnik, S.E., Ginger, M.L., Dacks, J.B., Carpenter, M.L., Field, M.C., Kuo, A., Paredez, A., Chapman, J., Pham, J., et al. (2010). The Genome of *Naegleria gruberi* Illuminates Early Eukaryotic Versatility. *Cell* 140, 631–642.
- Gakh, O., Cavadini, P., and Isaya, G. (2002). Mitochondrial processing peptidases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1592, 63–77.
- Gawryluk, R.M.R., Chisholm, K.A., Pinto, D.M., and Gray, M.W. (2012). Composition of the mitochondrial electron transport chain in *acanthamoeba castellanii*: structural and evolutionary insights. *Biochimica et Biophysica Acta* 1817, 2027–2037.
- Gawryluk, R.M.R., Chisholm, K.A., Pinto, D.M., and Gray, M.W. (2014). Compositional complexity of the mitochondrial proteome of a unicellular eukaryote (*Acanthamoeba castellanii*, supergroup Amoebozoa) rivals that of animals, fungi, and plants. *Journal of Proteomics* 109, 400–416.
- Gelius-Dietrich, G., and Henze, K. (2004). Pyruvate formate lyase (PFL) and PFL activating enzyme in the chytrid fungus *Neocallimastix frontalis*: a free-radical enzyme system conserved across divergent eukaryotic lineages. *Journal of Eukaryotic Microbiology* 51, 456–463.
- Giezen, M. van der, and Tovar, J. (2005). Degenerate mitochondria. *EMBO Reports* 6, 525–530.
- Gijzen, H.J., Broers, C.A., Barughare, M., and Stumm, C.K. (1991). Methanogenic bacteria as endosymbionts of the ciliate *Nyctotherus ovalis* in the cockroach hindgut. *Applied and Environmental Microbiology* 57, 1630–1634.
- Gill, E.E., Diaz-Trivino, S., Barbera, M.J., Silberman, J.D., Stechmann, A., Gaston, D., Tamas, I., and Roger, A.J. (2007). Novel mitochondrion-related organelles in the anaerobic amoeba *Mastigamoeba balamuthi*. *Molecular Microbiology* 66, 1306–1320.
- Goldberg, A.V., Molik, S., Tsaousis, A.D., Neumann, K., Kuhnke, G., Delbac, F., Vivares, C.P., Hirt, R.P., Lill, R., and Embley, T.M. (2008). Localization and functionality of microsporidian iron-sulphur cluster assembly proteins. *Nature* 452, 624–628.
- De Graaf, R.M., Ricard, G., van Alen, T.A., Duarte, I., Dutilh, B.E., Burgtorf, C., Kuiper, J.W.P., van der Staay, G.W.M., Tielens, A.G.M., Huynen, M.A., et al. (2011). The Organellar Genome and Metabolic Potential of the Hydrogen-Producing Mitochondrion of *Nyctotherus ovalis*. *Molecular Biology and Evolution* 28, 2379–2391.
- Gray, M.W. (1999). Evolution of organellar genomes. *Current Opinion in Genetics & Development* 9, 678–687.

- Gray, M.W. (2014). The Pre-Endosymbiont Hypothesis: A New Perspective on the Origin and Evolution of Mitochondria. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 6, a016097.
- Van Grinsven, K.W.A., Rosnowsky, S., van Weelden, S.W.H., Pütz, S., van der Giezen, M., Martin, W., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G.M., and Henze, K. (2008). Acetate:succinate CoA-transferase in the hydrogenosomes of *Trichomonas vaginalis*: identification and characterization. *The Journal of Biological Chemistry* 283, 1411–1418.
- Heinemann, I.U., Jahn, M., and Jahn, D. (2008). The biochemistry of heme biosynthesis. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 474, 238–251.
- Hjort, K., Goldberg, A.V., Tsaousis, A.D., Hirt, R.P., and Embley, T.M. (2010). Diversity and reductive evolution of mitochondria among microbial eukaryotes. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 365, 713–727.
- Hoffmeister, M., van der Klei, A., Rotte, C., van Grinsven, K.W.A., van Hellemond, J.J., Henze, K., Tielens, A.G.M., and Martin, W. (2004). *Euglena gracilis* rholoquinone:ubiquinone ratio and mitochondrial proteome differ under aerobic and anaerobic conditions. *The Journal of Biological Chemistry* 279, 22422–22429.
- Horner, D.S., Foster, P.G., and Embley, T.M. (2000). Iron hydrogenases and the evolution of anaerobic eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* 17, 1695–1709.
- Hrdy, I., Hirt, R.P., Dolezal, P., Bardonova, L., Foster, P.G., Tachezy, J., and Embley, T.M. (2004). *Trichomonas* hydrogenosomes contain the NADH dehydrogenase module of mitochondrial complex I. *Nature* 432, 618–622.
- Inui, H., Miyatake, K., Nakano, Y., and Kitaoka, S. (1983). Production and Composition of Wax Esters by Fermentation of *Euglena-Gracilis*. *Agricultural and Biological Chemistry* 47, 2669–2671.
- Inui, H., Ono, K., Miyatake, K., Nakano, Y., and Kitaoka, S. (1987). Purification and characterization of pyruvate:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase in *Euglena gracilis*. *The Journal of Biological Chemistry* 262, 9130–9135.
- Jedelský, P.L., Doležal, P., Rada, P., Pyrih, J., Šmíd, O., Hrdý, I., Šedinová, M., Marcinčíková, M., Voleman, L., Perry, A.J., et al. (2011). The Minimal Proteome in the Reduced Mitochondrion of the Parasitic Protist *Giardia intestinalis*. *PLoS ONE* 6.
- Jerlstrom-Hultqvist, J., Einarsson, E., Xu, F., Hjort, K., Ek, B., Steinhauf, D., Hultenby, K., Bergquist, J., Andersson, J.O., and Svard, S.G. (2013). Hydrogenosomes in the diplomonad *Spirionucleus salmonicida*. *Nature Communications* 4, 2493.
- Katinka, M.D., Duprat, S., Cornillot, E., Méténier, G., Thomarat, F., Prensier, G., Barbe, V., Peyretailade, E., Brottier, P., Wincker, P., et al. (2001). Genome sequence and gene compaction of the eukaryote parasite *Encephalitozoon cuniculi*. *Nature* 414, 450–453.
- Knoll, A.H., Javaux, E.J., Hewitt, D., and Cohen, P. (2006). Eukaryotic organisms in Proterozoic oceans. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences* 361, 1023–1038.
- Kurland, C.G., and Andersson, S.G. (2000). Origin and evolution of the mitochondrial proteome. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 64, 786–820.

- LaGier, M.J., Tachezy, J., Stejskal, F., Kutisova, K., and Keithly, J.S. (2003). Mitochondrial-type iron-sulfur cluster biosynthesis genes (*IscS* and *IscU*) in the apicomplexan *Cryptosporidium parvum*. *Microbiology-SGM* *149*, 3519–3530.
- Lahti, C.J., Bradley, P.J., and Johnson, P.J. (1994). Molecular characterization of the alpha-subunit of *Trichomonas vaginalis* hydrogenosomal succinyl CoA synthetase. *Molecular and Biochemical Parasitology* *66*, 309–318.
- Lake, J., and Rivera, M. (1994). Was the Nucleus the 1st Endosymbiont. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *91*, 2880–2881.
- Lantsman, Y., Tan, K.S.W., Morada, M., and Yarlett, N. (2008). Biochemical characterization of a mitochondrial-like organelle from *Blastocystis* sp. subtype 7. *Microbiology-SGM* *154*, 2757–2766.
- Lebert, M., and Hader, D.P. (1997). Behavioral mutants of *Euglena gracilis*: functional and spectroscopic characterization. *Journal of Plant Physiology* *151*, 188–195.
- Lee, J. (2010). De novo formation of basal bodies during cellular differentiation of *Naegleria gruberi*: progress and hypotheses. *Seminars in Cell & Developmental Biology* *21*, 156–162.
- Lill, R., Diekert, K., Kaut, A., Lange, H., Pelzer, W., Prohl, C., and Kispal, G. (1999). The essential role of mitochondria in the biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *The Journal of Biological Chemistry* *380*, 1157–1166.
- Lindmark, D.G., and Müller, M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Tritrichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* *248*, 7724–7728.
- Van Lis, R., Baffert, C., Coute, Y., Nitschke, W., and Atteia, A. (2013). *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts Contain a Homodimeric Pyruvate: Ferredoxin Oxidoreductase That Functions with FDX1. *Plant Physiology* *161*, 57–71.
- Maguire, F., and Richards, T.A. (2014). Organelle Evolution: A Mosaic of “Mitochondrial” Functions. *Current Biology* *24*, R518–R520.
- Mai, Z., Ghosh, S., Frisardi, M., Rosenthal, B., Rogers, R., and Samuelson, J. (1999). Hsp60 is targeted to a cryptic mitochondrion-derived organelle (“crypton”) in the microaerophilic protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular and Cellular Biology* *19*, 2198–2205.
- Makiuchi, T., and Nozaki, T. (2014). Highly divergent mitochondrion-related organelles in anaerobic parasitic protozoa. *Biochimie* *100*, 3–17.
- Maralikova, B., Ali, V., Nakada-Tsukui, K., Nozaki, T., van der Giezen, M., Henze, K., and Tovar, J. (2010). Bacterial-type oxygen detoxification and iron-sulfur cluster assembly in amoebal relict mitochondria. *Cellular Microbiology* *12*, 331–342.
- Margulis, L. (1996). Archaeal-eubacterial mergers in the origin of Eukarya: phylogenetic classification of life. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *93*, 1071–1076.
- Martin, W., and Muller, M. (1998). The hydrogen hypothesis for the first eukaryote. *Nature* *392*, 37–41.

- Marvin-Sikkema, F.D., Pedro Gomes, T.M., Grivet, J.P., Gottschal, J.C., and Prins, R.A. (1993). Characterization of hydrogenosomes and their role in glucose metabolism of *Neocallimastix* sp. L2. *Archives of Microbiology* *160*, 388–396.
- Mi-ichi, F., Yousuf, M.A., Nakada-Tsukui, K., and Nozaki, T. (2009). Mitosomes in *Entamoeba histolytica* contain a sulfate activation pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *106*, 21731–21736.
- Mi-ichi, F., Makiuchi, T., Furukawa, A., Sato, D., and Nozaki, T. (2011). Sulfate Activation in Mitosomes Plays an Important Role in the Proliferation of *Entamoeba histolytica*. *PLoS Neglected Tropical Diseases* *5*.
- Miller, W.L. (1995). Mitochondrial specificity of the early steps in steroidogenesis. *The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology* *55*, 607–616.
- Mogi, T., and Kita, K. (2010). Diversity in mitochondrial metabolic pathways in parasitic protists *Plasmodium* and *Cryptosporidium*. *Parasitology International* *59*, 305–312.
- Moreira, D., and Lopez-Garcia, P. (1998). Symbiosis between methanogenic archaea and delta-proteobacteria as the origin of eukaryotes: The syntrophic hypothesis. *Journal of Molecular Evolution* *47*, 517–530.
- Muller, M. (1993). The Hydrogenosome. *Journal of General Microbiology* *139*, 2879–2889.
- Müller, M., Mentel, M., van Hellemond, J.J., Henze, K., Woehle, C., Gould, S.B., Yu, R.-Y., van der Giezen, M., Tielens, A.G.M., and Martin, W.F. (2012). Biochemistry and Evolution of Anaerobic Energy Metabolism in Eukaryotes. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* *76*, 444–495.
- Mus, F., Dubini, A., Seibert, M., Posewitz, M.C., and Grossman, A.R. (2007). Anaerobic Acclimation in *Chlamydomonas reinhardtii*, anoxic gene expression, hydrogenase induction, and metabolic pathways. *The Journal of Biological Chemistry* *282*, 25475–25486.
- Ntefidou, M., Iseki, M., Watanabe, M., Lebert, M., and Häder, D.-P. (2003). Photoactivated Adenylyl Cyclase Controls Phototaxis in the Flagellate *Euglena gracilis*. *Plant Physiology* *133*, 1517–1521.
- Nývltová, E., Šuták, R., Harant, K., Šedinová, M., Hrdý, I., Pačes, J., Vlček, Č., and Tachezy, J. (2013). NIF-type iron-sulfur cluster assembly system is duplicated and distributed in the mitochondria and cytosol of *Mastigamoeba balamuthi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *110*, 7371–7376.
- Nývltová, E., Stairs, C.W., Hrdý, I., Rídl, J., Mach, J., Pačes, J., Roger, A.J., and Tachezy, J. (2015). Lateral Gene Transfer and Gene Duplication Played a Key Role in the Evolution of *Mastigamoeba balamuthi* Hydrogenosomes. *Molecular Biology and Evolution* *32*, 1039–1055.
- Ofallon, J., Wright, R., and Calza, R. (1991). Glucose Metabolic Pathways in the Anaerobic Rumen Fungus *Neocallimastix-Fontalis* Eb188. *Biochemical Journal* *274*, 595–599.
- O’Kelly, C.J., Silberman, J.D., Zettler, L. a. A., Nerad, T.A., and Sogin, M.L. (2003). *Monopylocystis visvesvarai* n. gen., n. sp and *Sawyeria marylandensis* n. gen., n. sp.: Two new amitochondrial heterolobosean amoebae from anoxic environments. *Protist* *154*, 281–290.

- Opperdoes, F.R., De Jonckheere, J.F., and Tielens, A.G.M. (2011). *Naegleria gruberi* metabolism. *International Journal for Parasitology* 41, 915–924.
- Radakovits, R., Jinkerson, R.E., Darzins, A., and Posewitz, M.C. (2010). Genetic Engineering of Algae for Enhanced Biofuel Production. *Eukaryotic Cell* 9, 486–501.
- Raeburn, S., and Rabinowitz, J.C. (1971). Pyruvate: Ferredoxin oxidoreductase: II. Characteristics of the forward and reverse reactions and properties of the enzyme. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 146, 21–33.
- Riordan, C.E., Ault, J.G., Langreth, S.G., and Keithly, J.S. (2003). *Cryptosporidium parvum* Cpn60 targets a relict organelle. *Current Genetics* 44, 138–147.
- Risgaard-Petersen, N., Langezaal, A.M., Ingvarsdén, S., Schmid, M.C., Jetten, M.S.M., Op den Camp, H.J.M., Derksen, J.W.M., Piña-Ochoa, E., Eriksson, S.P., Peter Nielsen, L., et al. (2006). Evidence for complete denitrification in a benthic foraminifer. *Nature* 443, 93–96.
- Rochette, N.C., Brochier-Armanet, C., and Gouy, M. (2014). Phylogenomic test of the hypotheses for the evolutionary origin of eukaryotes. *Molecular Biology and Evolution* mst272.
- Rodríguez-Ezpeleta, N., and Embley, T.M. (2012). The SAR11 Group of Alpha-Proteobacteria Is Not Related to the Origin of Mitochondria. *PLoS ONE* 7, e30520.
- Smíd, O., Matusková, A., Harris, S.R., Kucera, T., Novotný, M., Horváthová, L., Hrdý, I., Kutejová, E., Hirt, R.P., Embley, T.M., et al. (2008). Reductive evolution of the mitochondrial processing peptidases of the unicellular parasites *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*. *PLoS Pathogens* 4, e1000243.
- Stairs, C.W., Eme, L., Brown, M.W., Mutsaers, C., Susko, E., Dellaire, G., Soanes, D.M., van der Giezen, M., and Roger, A.J. (2014). A SUF Fe-S Cluster Biogenesis System in the Mitochondrion-Related Organelles of the Anaerobic Protist *Pygsuia*. *Current Biology* 24, 1176–1186.
- Stechmann, A., Hamblin, K., Pérez-Brocal, V., Gaston, D., Richmond, G.S., van der Giezen, M., Clark, C.G., and Roger, A.J. (2008). Organelles in *Blastocystis* that blur the distinction between mitochondria and hydrogenosomes. *Current Biology* 18, 580–585.
- Sutak, R., Tachezy, J., Kulda, J., and Hrdý, I. (2004). Pyruvate decarboxylase, the target for omeprazole in metronidazole-resistant and iron-restricted *Trichomonas foetus*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 48, 2185–2189.
- Sutak, R., Hrdý, I., Dolezal, P., Cabala, R., Sedinová, M., Lewin, J., Harant, K., Müller, M., and Tachezy, J. (2012). Secondary alcohol dehydrogenase catalyzes the reduction of exogenous acetone to 2-propanol in *Trichomonas vaginalis*. *FEBS Journal* 279, 2768–2780.
- Tachezy, J., Sanchez, L.B., and Muller, M. (2001). Mitochondrial type iron-sulfur cluster assembly in the amitochondriate eukaryotes *Trichomonas vaginalis* and *Giardia intestinalis*, as indicated by the phylogeny of IscS. *Molecular Biology and Evolution* 18, 1919–1928.
- Tan, K.S.W. (2008). New Insights on Classification, Identification, and Clinical Relevance of *Blastocystis* spp. *Clinical Microbiology Reviews* 21, 639–665.

Tielens, A.G.M., Rotte, C., van Hellemond, J.J., and Martin, W. (2002). Mitochondria as we don't know them. *Trends in Biochemical Sciences* 27, 564–572.

Tovar, J., Fischer, A., and Clark, C.G. (1999). The mitosome, a novel organelle related to mitochondria in the amitochondrial parasite *Entamoeba histolytica*. *Molecular Microbiology* 32, 1013–1021.

Tovar, J., León-Avila, G., Sánchez, L.B., Sutak, R., Tachezy, J., van der Giezen, M., Hernández, M., Müller, M., and Lucocq, J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* 426, 172–176.

Tovar, J., Cox, S.S.E., and van der Giezen, M. (2007). A mitosome purification protocol based on percoll density gradients and its use in validating the mitosomal nature of *Entamoeba histolytica* mitochondrial Hsp70. *Methods in Molecular Biology* 390, 167–177.

Truscott, K.N., Brandner, K., and Pfanner, N. (2003). Mechanisms of protein import into mitochondria. *Current Biology* 13, R326–R337.

Tsaousis, A.D., Nyvltova, E., Sutak, R., Hrdy, I., and Tachezy, J. (2014). A Nonmitochondrial Hydrogen Production in *Naegleria gruberi*. *Genome Biology and Evolution* 6, 792–799.

Vignais, P.M., Billoud, B., and Meyer, J. (2001). Classification and phylogeny of hydrogenases. *FEMS Microbiology Reviews* 25, 455–501.

Williams, T.A., and Embley, T.M. (2014). Archaeal “Dark Matter” and the Origin of Eukaryotes. *Genome Biology and Evolution* 6, 474–481.

Williams, B.A.P., Hirt, R.P., Lucocq, J.M., and Embley, T.M. (2002). A mitochondrial remnant in the microsporidian *Trachipleistophora hominis*. *Nature* 418, 865–869.

Williams, T.A., Foster, P.G., Cox, C.J., and Embley, T.M. (2013). An archaeal origin of eukaryotes supports only two primary domains of life. *Nature* 504, 231–236.

Yarlett, N., Orpin, C., Munn, E., Yarlett, N., and Greenwood, C. (1986). Hydrogenosomes in the Rumen Fungus *Neocallimastix-Patriciarum*. *Biochemical Journal* 236, 729–739.

Youssef, N.H., Couger, M.B., Struchtemeyer, C.G., Ligginstoffer, A.S., Prade, R.A., Najar, F.Z., Atiyeh, H.K., Wilkins, M.R., and Elshahed, M.S. (2013). The Genome of the Anaerobic Fungus *Orpinomyces* sp Strain C1A Reveals the Unique Evolutionary History of a Remarkable Plant Biomass Degrader. *Applied and Environmental Microbiology* 79, 4620–4634.

Zhang, X., Zhang, S., Qiao, J., Wu, X., Zhao, L., Liu, Y., and Fan, X. (2012). Ultrastructural insights into morphology and reproductive mode of *Blastocystis hominis*. *Parasitology Research* 110, 1165–1172.

<https://publi.cz/books/89/images/pics/158.jpg>

[http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ea/Euglena\\_diagram.jpg](http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/ea/Euglena_diagram.jpg)

<http://www.shigen.nig.ac.jp/algae/images/strainsimage/nies-0048.jpg>