

PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA UNIVERZITY KARLOVY

Katedra parazitologie



Biogeneze mitochondrií a příbuzných organel

Luboš Voleman

Bakalářská práce

Praha, 2009

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Doležal, PhD.

Poděkování: Vedoucí práce Mgr. Pavel Doležal, PhD., poskytl řadu přínosných rad a neocenitelnou pomoc a ochotu při zpracování práce. Prof. RNDr. Jan Tachezy, PhD., vytvořil podnětné tvůrčí prostředí zapojením autora práce do řešitelského týmu ve své laboratoři. Děkuji.

Praha 2.8.2009

Prohlašuji, že jsem zadanou bakalářskou práci vypracoval sám a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje. Souhlasím se zapůjčováním práce.

Praha 2.8.2009

Abstrakt

Práce shrnuje dosavadní poznatky týkající se problému biogeneze mitochondrií. Důraz je kladen především na téma mitochondriální dynamiky u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a u člověka. Jsou zde popisovány procesy mitochondriální fúze a dělení jako dva nejdůležitější procesy mitochondriální dynamiky. Na důkaz tohoto tvrzení jsou uvedena závažná lidská onemocnění způsobená defekty v těchto procesech, syndrom Charcot-Marie-Tooth a autosomálně dominantní optická atrofie.

Dále práce shrnuje poznatky týkající se mitochondriálního dělení u skupiny parazitických prvoků, konkrétně u zástupců *Trypanosoma brucei* a *Toxoplasma gondii*, a pomocí homologů bakteriálního FtsZ proteinu.

Hydrogenosomy, organely příbuzné mitochondriím, také podle dosavadních poznatků podléhají procesu dělení, nicméně jejich fúze zatím nebyla pozorována.

Závěrem zde uvádím dosavadní výsledky mé práce v laboratoři molekulární a biochemické parazitologie, kde studuji dynamiku mitosomů *Giardia intestinalis*. Tyto výsledky by měly být zkompletovány během mého magisterského studia.

Klíčová slova: mitochondrie, mitochondriální dynamika, FtsZ protein, hydrogenosomy, mitosomy.

Abstract

The work summarizes existing data referring to biogenesis of mitochondria. It is focused mainly on dynamics of mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* and human. The most important processes of mitochondrial dynamics are mitochondrial fusion and division. To prove this affirmation two serious human diseases are described here. They are Charcot-Marie-Tooth syndrome and autosomal dominant optic atrophy.

The work also resumes data referring to mitochondrial division of two parasitic protists, *Trypanosoma brucei* and *Toxoplasma gondii*, and mitochondrial division using homologues of bacterial FtsZ protein.

Hydrogenosomes, organelles related to mitochondria, divide too however nothing is known about their fusion.

The last chapter presents results of my work in the laboratory of molecular and biochemical parasitology where I study dynamics of *Giardia intestinalis* mitosomes. These results will be completed during the course of my work on master thesis.

Key words: Mitochondria, Mitochondrial dynamics, FtsZ protein, Hydrogenosomes, Mitosomes

Obsah

1 Úvod	7
2 Mitochondriální dynamika	7
2.1 Mitochondriální fúze	8
2.1.1.1 Fzo1p.....	8
2.1.1.2 Mgm1p.....	9
2.1.1.3 Ugo1p.....	10
2.1.2 Mitochondriální fúze a morfologie krist.....	11
2.1.4 Modely mitochondriální fúze.....	11
2.1.5 Regulace mitochondriální fúze.....	13
2.2 Mitochondriální dělení	13
2.2.1.1 Dnm1p.....	14
2.2.1.2 Cílení Dnm1p/Drp1p do vnější mitochondriální membrány pomocí Fis1p, Mdv1p, Caf4p, a Num1p.....	15
2.2.2 Modely mitochondriálního dělení.....	16
2.2.3 Regulace mitochondriálního dělení.....	17
3 Nemoci spojené s defekty v mitochondriální dynamice	19
3.1 Autosomálně dominantní optická atrofie.....	19
3.2 Syndrom Charcot-Marie-Tooth.....	19
4 FtsZ protein a dělení mitochondrie	20
5 Mitochondriální dělení u parazitických prvoků	20
5.1 <i>Toxoplasma gondii</i>	21
5.2 <i>Trypanosoma brucei</i>	21
6 Hydrogenosomy	22
7 <i>Giardia intestinalis</i>	23
8 Závěr a hodnocení	25
9 Seznam literatury	25

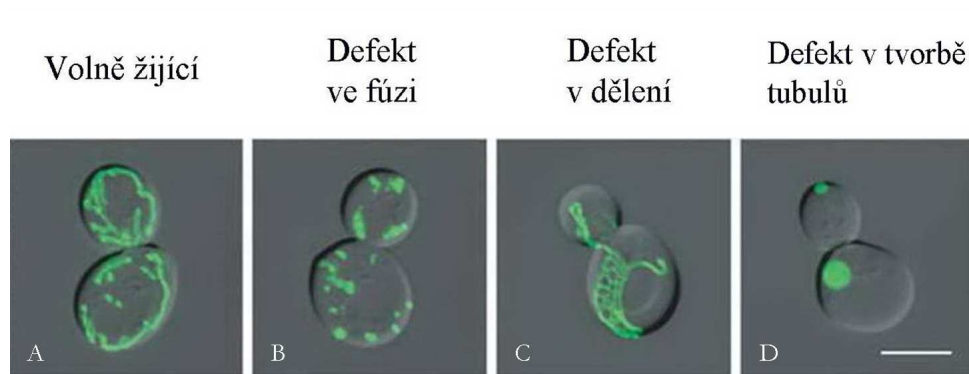
1 Úvod

Mitochondrie jsou dvojmembránové organely s velice specializovanou funkcí a morfologií. Na příčném řezu kvasinkovou mitochondrií můžeme rozlišit čtyři oddělené struktury. Jsou to vnější a vnitřní mitochondriální membrána oddělené mezimembránovým prostorem, a tzv. matrix, která vyplňuje vnitřek mitochondrie. V matrix se kromě proteinů nachází i mitochondriální DNA, která je navázána na vnitřní membránu (Okamoto and Shaw, 2005). Tento mitochondriální genom vyžaduje přítomnost vlastního transkripčního a translačního aparátu, který je však do mitochondrie importován z cytosolických ribosomů. Mitochondrie jsou známy jako hlavní producenti buněčného ATP (Attardi and Schatz, 1988), ale zprostředkovávají také syntézu některých aminokyselin a lipidů, podílí se na buněčné signalizaci a v neposlední řadě kontrolují programovanou buněčnou smrt (Danial and Korsmeyer, 2004). Na rozdíl od organel endomembránového systému mitochondrie nevznikají *de novo* a jejich distribuce a propagace do dceřiných buněk je kontrolována specifickou mašinérií proteinů, které zajišťují jejich dělení a fúzi. Mezi dělením a fúzí existuje dynamická rovnováha, která je pro buňku nesmírně důležitá.

2 Mitochondriální dynamika

V souvislosti s mitochondriemi je komplikované mluvit o jejich biogenezi. Jak již bylo zmíněno, nevznikají *de novo*, nýbrž se utvářejí z již funkčních mitochondrií přítomných v buňce. Jsou to nesmírně dynamické organely. V závislosti na životním stylu je buňka schopna regulovat strukturu mitochondrií a jejich organizaci. Ve volně žijících kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* tvoří síťovitou strukturu procházející celou buňkou (Obrázek 1). Mutace v určitých jaderných genech narušují tuto přirozenou morfologii a vedou k poruchám projevujícím se rozdílnými mitochondriálními fenotypy (Okamoto and Shaw, 2005).

Tyto fenotypy definují tři základní dráhy, které určují tvar a velikost mitochondrie (Obr. 1). První dráha je zodpovědná za mitochondriální fúzi. Pokud je fúze zablokována, mitochondriální síť se rozpadá (Obr. 1B). Druhá dráha zprostředkovává proces mitochondriálního dělení. Důsledkem její dysfunkce se mitochondrie spojují a tvoří propojené kondenzované útvary (Obr. 1C). Poslední dráha kontroluje tvorbu mitochondriálních tubulů. Při přerušení této dráhy dochází k přeměně mitochondrií na velké kulovité váčky bez tubulace (Okamoto and Shaw, 2005). Z hlediska biogeneze mitochondrií jsou nejdůležitější procesy mitochondriální fúze a dělení. Pro buňku je nesmírně důležité mezi těmito dvěma procesy udržovat dynamickou rovnováhu, kterou je schopna v případě potřeby posunout jedním nebo druhým směrem.



Obrázek 1:

*Rozložení mitochondrií v kvasince *Saccharomyces cerevisiae*. Volně žijící buňky a mutanty s různými defekty v mitochondriální morfologii. Mitochondrie jsou vizualizovány pomocí GFP (převzato z Okamoto and Shaw, 2005).*

2.1 Mitochondriální fúze

Proteiny, které se účastní mitochondriální fúze, jsou určeny výhradně pro procesy mitochondriální dynamiky. Naproti tomu veškeré další intracelulární membránové fúze jsou zprostředkovány tzv. SNARE proteiny (viz. kapitola 7, odstavec 2).

U kvasinek se na mitochondriální fúzi podílí dvě GTPázy Fzo1p (Mfn1/Mfn2) a Mgm1p (OPA1) a protein Ugo1p. (Proteiny v závorkách jsou homology nalezeny v buňkách živočichů). Funkční komplex, který tyto proteiny dohromady vytvářejí, zároveň zajišťuje koordinované propojení fúze obou mitochondriálních membrán.

2.1.1.1 Fzo1p

GTPázy jsou klíčovými proteiny mitochondriální fúze a v průběhu času byly nalezeny napříč různými skupinami eukaryot: Fzo (fuzzy onions) v kvasince (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998) a drosophile (Hales and Fuller, 1997) a Mfn (mitofusin) u savců (Santel and Fuller, 2001; Eura *et al.*, 2003). Kvasinkový Fzo1 se ukázal jako esenciální pro život buňky (Hermann *et al.*, 1998). Jedná se o asi 98kDa veliký protein, který se skládá ze tří sedmičlenných repetič (heptad repeats), jedné N-koncové GTPázové domény a dvou C-koncových transmembránových segmentů (Hales and Fuller, 1997). Jde o integrální membránový protein vnější mitochondriální membrány zodpovědný za její fúzi. Jeho GTPázová doména vyčnívá do cytoplazmy a krátký spoj dvou transmembránových úseků je

exponován do mezimembránového prostoru a má důležitou funkci při kontaktu obou membrán (Hermann *et al.*, 1998;Fritz *et al.*, 2001).

Savčí Mfn1 a Mfn2 jsou konzervované homology Fzo1. U těchto dvou proteinů nebyl zatím plně objasněn mechanismus jejich fungování při mitochondriální fúzi v savčích buňkách, nicméně je jisté, že jsou také pro fúzi esenciální (Ishihara *et al.*, 2004). Poškození těchto proteinů také vede k neurodegenerativnímu onemocnění syndromu Charcot-Marie-Tooth (viz. kapitola 3.2).

Nedávná práce ukazuje, že Mfn2 se kromě mitochondrií nachází také na povrchu endoplasmatického retikula, kde zprostředkovává interakce právě mezi mitochondrií a retikulem. Tyto interakce mohou být *trans*-homo i heterotypické, jelikož Mfn2 na endoplasmatickém retikulu může párovat jak s Mfn1 tak s Mfn2. Tato spojení se ukázala jako nezbytná pro správný přísun vápenatých iontů do mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008).

2.1.1.2 Mgm1p

Mgm1 je další GTPáza fungující při mitochondriální fúzi. Jedná se o protein příbuzný dynaminovým GTPázám, které hrají roli při zaškrcování membrán během endocytózy (Praefcke and McMahon, 2004). Skládá se z N-koncové mitochondriální targetovací presekvence, dvou hydrofobních segmentů a GTPázové domény, která je nutná pro funkci proteinu *in vivo* (Shepard and Yaffe, 1999;Sesaki *et al.*, 2003). Ortology tohoto proteinu byly identifikovány i v jiných eukaryotických organismech jako u *Schizosaccharomyces cerevisiae* (Msp1) (Pelloquin *et al.*, 1998;Pelloquin *et al.*, 1999), či u savců (OPA1) (Alexander *et al.*, 2000;Delettre *et al.*, 2000).

O správné topologii tohoto proteinu se donedávna vedly diskuze, nicméně podle poslední studie (Guillou *et al.*, 2005) se zdá, že jde o protein mezimembránového prostoru zakotvený ve vnitřní mitochondriální membráně. Mgm1 je nicméně v buňce přítomen ve dvou formách, a to jednak ve "dlouhé" formě (l-Mgm1p), která je membránově zakotvená, a jednak v "krátké" formě (s-Mgm1p), která je solubilní v mezimembránovém prostoru (Meeusen *et al.*, 2006;Chan, 2006). Mgm1p je po translokaci do mitochondriální matrix procesován matrixovou procesující peptidázou (MPP) a poté integrován do vnitřní mitochondriální membrány díky N-koncové transmembránové sekvenci. s-Mgm1p vzniká dalším procesováním již ve vnitřní mitochondriální membráně a poté je uvolněn do mezimembránového prostoru (Cervený *et al.*, 2007b). Různé procesování Mgm1p má na starost membránová proteáza v mezimembránovém prostoru Pcp1p (Sesaki *et al.*, 2006). Tvorba alternativních forem tohoto proteinu může být považována za určitou formu regulace

mitochondriální fúze. Bylo prokázáno, že při nízké hladině ATP je v buňce přítomna především "dlouhá" forma proteinu, zatímco při vysoké hladině ATP "krátká" forma (Herlan *et al.*, 2004). Regulace poměru "krátké" a "dlouhé" formy pak může hypoteticky zabránit „vadným“ mitochondriím fúzovat se „zdravými“.

Savčím homologem Mgm1p je OPA1. Topologie tohoto proteinu je ještě komplikovanější než u Mgm1p. OPA1 je exprimován v osmi různých sestřihových variantách a každá z těchto variant může tvořit "krátké" a "dlouhé" formy. I tento fenomén je považován za způsob regulace mitochondriální morfologie (Ishihara *et al.*, 2006). Není zcela jisté, jaký protein je zodpovědný za procesování OPA1. Zdálo se, že za tento proces zodpovídá savčí homolog proteinu Pcp1p, tzv. PARL. Nicméně se ukazuje, že PARL neovlivňuje přímo samotnou mitochondriální fúzi, ale postihuje remodelaci mitochondriálních krist (Cipolat *et al.*, 2006).

Kromě PARL existují další tři proteiny ovlivňující procesování OPA1. Jsou to dvě proteázy patřící do skupiny tzv. m-AAA proteáz, a to AFG3L2 (Duvezin-Caubet *et al.*, 2007) a Paraplegin (Ishihara *et al.*, 2006), a jedna proteáza mezimembránového prostoru, tzv. i-AAA proteáza, Yme1 (Song *et al.*, 2007; Griparic *et al.*, 2007).

Ačkoli není přesně znám význam jednotlivých forem proteinů Mgm1 a OPA1, je jisté, že pro správnou mitochondriální fúzi jsou zapotřebí obě formy (krátká i dlouhá) těchto proteinů (Hoppins *et al.*, 2007).

2.1.1.3 Ugo1p

Ugo1 je protein vnější mitochondriální membrány o velikosti přibližně 56 kDa (Sesaki and Jensen, 2001). Jeho funkce spočívá v propojení obou GTPáz Fzo1p a Mgm1p a tím v synchronizaci fúzí obou membrán (Sesaki and Jensen, 2004). Obsahuje dvě domény podobné úsekům v mitochondriálních přenašečích, které transportují široké spektrum molekul přes vnitřní mitochondriální membránu. Ugo1 je považován za člena této proteinové rodiny, přesto je v určitých ohledech velmi odlišný. Oproti ostatním má téměř dvakrát větší molekulovou hmotnost, je lokalizován v semipermeabilní vnější mitochondriální membráně a konečně má opačnou N/C koncovou topologii (Sesaki and Jensen, 2001). Detailní topologie Ugo1p přesto není známa. Bylo prokázáno, že N-konec proteinu je exponován do cytoplasmy a C-konec naopak do mezimembránového prostoru. Počet transmembránových segmentů proteinu však zůstává neznámý (Coonrod *et al.*, 2007).

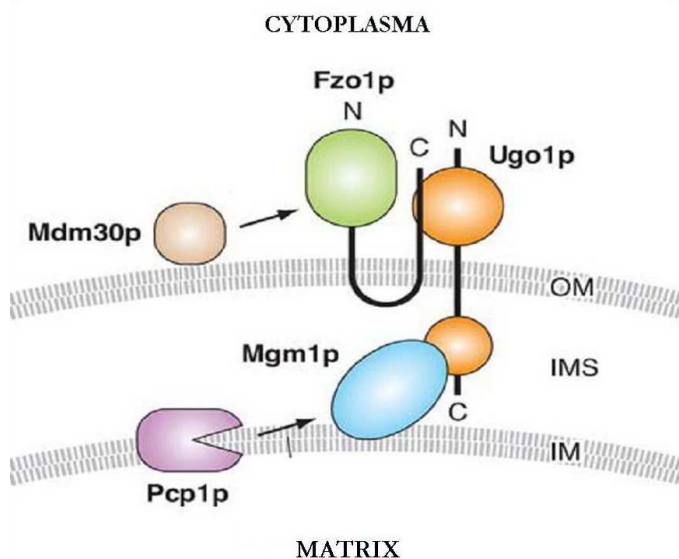
Při sestavování fúzního komplexu se zdá, že GTPázové domény proteinů Mgm1 a Fzo1 nejsou zodpovědné za jejich interakce s Ugo1p (Wong *et al.*, 2003; Sesaki and Jensen, 2004).

U savců zatím nebyl nalezen funkční homolog Ugo1p a mechanismus propojení vnější a vnitřní mitochondriální membrány tak zůstává neznámý (Hoppins *et al.*, 2007).

2.1.2 Mitochondriální fúze a morfologie krist

Mitochondriální kristy jsou výrazné struktury tvořené vnitřní mitochondriální membránou. Representují funkčně specializovaný kompartment mitochondrií (Vogel *et al.*, 2006). Vzhled mitochondriálních krist je velice rozmanitý. Mohou se lišit jak v délce tak ve tvaru a jsou propojeny v tzv. kristových spojích (Hoppins *et al.*, 2007).

Ukazuje se, že na vzhled mitochondriálních krist má mimo jiné vliv právě protein Mgm1. Tento protein byl pomocí elektronové mikroskopie v kristách lokalizován (Griparic *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2006). Snížení exprese OPA1 (savčího homologu Mgm1p) způsobuje dezorganizaci mitochondriálních krist a rozšiřování kristových spojů, zatímco jeho overexprese způsobuje zužování spojů i samotných krist (Griparic and van der Bliek, 2001; Olichon *et al.*, 2003; Frezza *et al.*, 2006).



Obrázek 2:

Lokalizace a topologie proteinů účastnících se mitochondriální fúze. Ugo1 protein interaguje s oběma GTPázami, Fzo1 i Mgm1. OM, vnější mitochondriální membrána; IM, vnitřní mitochondriální membrána; IMS, mezimembránový prostor (převzato z Okamoto and Shaw, 2005).

2.1.4 Modely mitochondriální fúze

I když modely mitochondriální fúze nejsou doposud zcela kompletní, je zřejmé, že se fúze dá rozdělit do tří fází: (i) spojení mitochondrií (docking), (ii) fúze vnější mitochondriální membrány a (iii) fúze vnitřní mitochondriální membrány. V savčích buňkách fúze nastává,

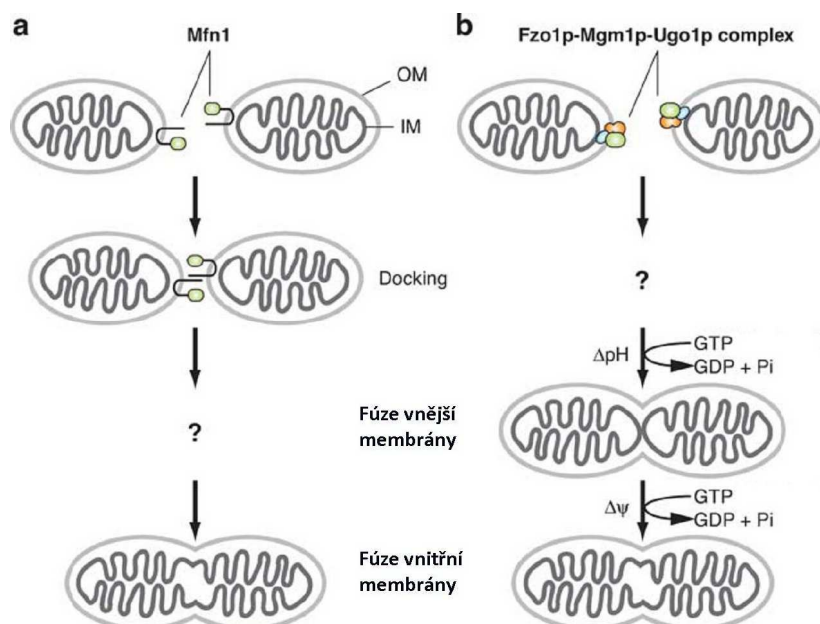
pokud se C-koncová doména proteinu Mfn1 na jedné mitochondrii spojí s C-koncovou doménou Mfn1 na druhé (Koshiba *et al.*, 2004) (Obrázek 3a). Toto spojení se nazývá *trans*-homotypická interakce. Předpokládá se, že tato interakce zvyšuje účinnost mitofusinů vázat, popř. hydrolyzovat GTP, což by mohlo mít za následek jejich konformační změnu a mitochondriální membrány by se tímto dostaly do bezprostřední blízkosti.

V souvislosti se savčími mitofusiny Mfn1 a Mfn2 je nezbytné ještě dodat, že jsou schopny tvořit i *trans*-heterotypické reakce Mfn1-Mfn2, nicméně význam těchto spojení nebyl zatím zcela objasněn (Chen *et al.*, 2003).

Pro fúzi mitochondrií je nezbytný potenciál na vnitřní mitochondriální membráně (Legros *et al.*, 2002; Ishihara *et al.*, 2003; Mattenberger *et al.*, 2003), avšak molekulární detaily mechanismu fúze vnějších membrán nebyly zatím dostatečně prozkoumány.

I v případě kvasinkového Fzo1 proteinu bylo prokázáno, že funkční proteiny na alespoň jedné mitochondrii účastníci se fúze jsou nezbytné (Griffin and Chan, 2006). Navíc jsou nezbytné všechny tři „heptad repeats“ na Fzo1p. Vlastní repetice se účastní vzájemných *trans* interakcí i vazby na GTPázovou doménu a zprostředkovávají tak oligomeraci Fzo1p komplexu. (Griffin and Chan, 2006).

Kolem mechanismu fungování Mgm1 proteinu při fúzi vnitřní membrány také stále zůstává mnoho neobjasněno. V podstatě jediné, co se dá s určitostí tvrdit, je, že pro správnou fúzi je kromě funkčního proteinu nezbytná přítomnost GTP a elektrického potenciálu vnitřní mitochondriální membrány (Okamoto and Shaw, 2005). Dosavadní znalosti o tom, jak probíhá mitochondriální fúze u kvasinek, jsou shrnuty na obrázku 3b.



Obrázek 3:

Modely mitochondriální fúze u savců (a) a kvasinek (b). OM, vnější mitochondriální membrána; IM, vnitřní mitochondriální membrána; $\Delta \psi$, elektrický potenciál vnitřní mitochondriální membrány; ΔpH , protonový gradient vnitřní mitochondriální membrány (převzato z Okamoto a Shaw, 2005).

2.1.5 Regulace mitochondriální fúze

Různé buněčné procesy se přímo či nepřímo podílejí na regulaci mitochondriální fúze. Nejvýznamnější z těchto procesů je apoptóza, při níž hraje mitochondrie klíčovou úlohu. Během apoptózy je evidentně porušena rovnováha mezi mitochondriální fúzí a dělením, což má za následek rozpad mitochondrií (Youle and Karbowski, 2005). Dva apoptotické proteiny, Bax a Bak, ovlivňují mitochondriální dynamiku nejen během programované buněčné smrti, ale ovlivňují i sestavování Mfn2 do multiproteinových komplexů (Karbowski *et al.*, 2006). Bylo prokázáno, že při absenci jednoho z těchto proteinů se komplexy s Mfn2 zmenšují a mění se i lokalizace samotného Mfn2 (Karbowski *et al.*, 2006). Podobně byly identifikovány proteiny Bcl-xL a CED-9, které fyzicky interagují s Mfn2 (Delivani *et al.*, 2006).

Fúzi reguluje i 55kDa veliký protein nazvaný MIB (Mfn-binding protein). MIB patří do rodiny proteinů které obsahují koenzym vazebnou doménu se specifickou sekvencí GGFG (Eura *et al.*, 2006). MIB je lokalizován převážně v cytoplazmě, nicméně se nachází i na endoplasmatickém retikulu a mitochondrii, kde se váže na Mfn1. Jeho funkce v cytoplazmě a na endoplasmatickém retikulu nebyla dosud objasněna (Eura *et al.*, 2006).

Již několik let je znám další protein ovlivňující mitochondriální fúzi: Mdm30p je protein dlouhý 598 aminokyselin o velikosti cca 70kDa. Nachází se převážně v cytosolu, ale je schopen asociace s mitochondriemi (Fritz *et al.*, 2003). Pomocí N-terminální F-Box domény a za přítomnosti ATP je Mdm30p schopen štěpit Fzo1p (Escobar-Henriques and Langer, 2006). Regulace fúze je ovlivňována i výše zmíněnými mechanismy procesování Mgm1 či alternativního setřihu mRNA pro OPA1.

2.2 Mitochondriální dělení

Základní úlohou mitochondriálního dělení je zajistit správné rozložení mitochondrií v buňce. Tento proces je řízen proteinem Dnm1 a ovlivňován řadou dalších jako např. Fis1, Mdv1 a Num1.

2.2.1.1 Dnm1p

Klíčovým faktorem mitochondriálního dělení je protein Dnm1, který náleží k proteinové rodině tzv. DRPs (dynamamin related proteins). Jako ostatní zástupci této rodiny i Dnm1p obsahuje funkční GTPázovou doménu a tzv. střední doménu. Podle strukturní predikce střední doména vytváří „coiled-coil“ struktury (van der Bliek, 1999; Hinshaw, 2000). Hlavní vlastností dynaminů je schopnost autopolymerace za přítomnosti GTP. Obě části proteinu se účastní inter- i intra-molekulových interakcí, které jsou nezbytné k polymeraci proteinu a hydrolyze GTP (Smirnova *et al.*, 1999). Dnm1p se skládá do komplexů, které jsou lokalizovány v cytosolu a na povrchu mitochondrií (Otsuga *et al.*, 1998). Tyto komplexy se v buňce objevují, jakmile dochází k mitochondriálnímu dělení (Naylor *et al.*, 2006), nicméně jen malá část vzniklých komplexů se dělení přímo účastní (Lackner and Nunnari, 2008). To naznačuje další možné funkce Dnm1p v buňce (Lackner and Nunnari, 2008).

Strukturní charakterizace Dnm1p ukázala souvislost polymerace s mitochondriálním dělením (Ingerman *et al.*, 2005). Pokud je na Dnm1p navázáno GTP, protein tvoří helikální struktury, které zaškrcují mitochondriální membránu. Pokud je do Dnm1p zavedena mutace způsobující neschopnost proteinu vázat GTP, žádné helikální struktury *in vitro* nevznikají a mitochondrie se nemohou dělit (Naylor *et al.*, 2006). V analogickém pokusu s mutantním proteinem, který je stále schopen GTP vázat, ale nehydrolyzovat, vznikají na mitochondriích supramolekulární helikální struktury. Ty však nejsou schopny proces dělení dokončit (Naylor *et al.*, 2006).

V savčích buňkách byl objeven homolog proteinu Dnm1, Drp1. Analogicky se Drp1 nachází převážně v cytosolu a jen malá frakce proteinu se nachází v mitochondrii (Smirnova *et al.*, 2001). I u Drp1p bylo prokázáno, že je schopen polymerace *in vitro*, nicméně s nižší účinností než Dnm1p a skládá se pouze do jednoduchých kroužků (Smirnova *et al.*, 2001). To naznačuje, že pro skládání Drp1p je zapotřebí dalších regulačních faktorů, které prozatím nebyly objeveny (Lackner and Nunnari, 2008).

Přestože Dnm1p a Drp1p jsou klíčovými faktory mitochondriálního dělení, jako takové nejsou samy schopné proces dělení uskutečnit. Během několika posledních let byla objevena řada dalších hráčů, kteří se přímo či nepřímo na mitochondriálním dělení podílejí

2.2.1.2 Cílení Dnm1p/Drp1p do vnější mitochondriální membrány pomocí Fis1p, Mdv1p, Caf4p, a Num1p

Na Dnm1p-závislé mitochondriální dělení vyžaduje další proteiny, které zajišťují cílení Dnm1p do vnější mitochondriální membrány (Lackner and Nunnari, 2008). Zde jsou zmíněné nejdůležitější z nich.

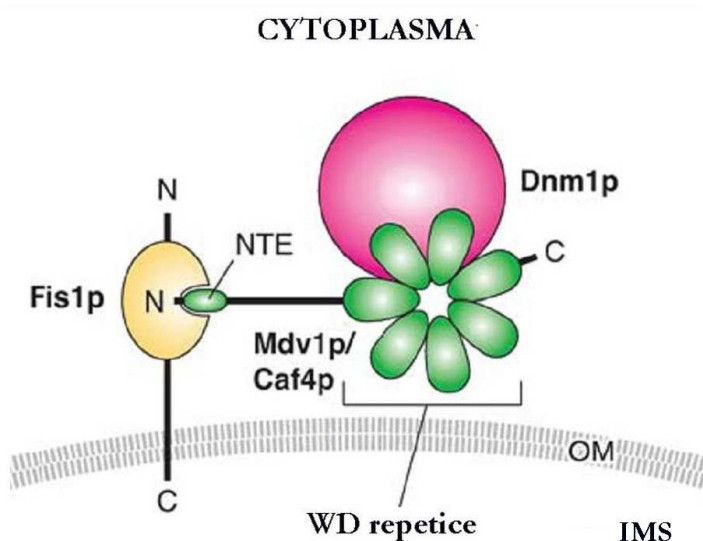
Jako první je třeba představit mechanismus pomocí Fis1p-Mdv1p interakcí. Fis1p je protein vnější mitochondriální membrány. Do ní je zakotven svou C-koncovou transmembránovou doménou (Obrázek 4). Na rozdíl od Dnm1p proteinu se v buňce nachází pouze v mitochondrii (Mozdy *et al.*, 2000). N-konec proteinu je exponován do cytosolu a je složen do tzv. "tetratricopeptide-like" (TPR) struktury (Suzuki *et al.*, 2003;Dohm *et al.*, 2004;Suzuki *et al.*, 2005). TPR motivy jsou zodpovědné za proteinové interakce. Jinak tomu není ani u Fis1p, který přes tento motiv interaguje s Mdv1 proteinem (Tieu and Nunnari, 2000;Karren *et al.*, 2005). Mdv1p slouží jako most spojující Fis1p se solubilním Dnm1p (Obr. 4) (Lackner and Nunnari, 2008). Skládá se ze tří částí: N-koncové části obsahující helix-loop-helix motiv, která zprostředkovává interakce s Fis1p, dále centrální coiled-coil doménu obsahující části zodpovědné za homo-oligomerizaci Mdv1p, a konečně z C-koncových WD repetičí, které interagují s Dnm1p. (Tieu and Nunnari, 2000;Tieu *et al.*, 2002;Cervený and Jensen, 2003).

Fis1 také interaguje s paralogem proteinu Mdv1p, Caf4p proteinem (Griffin *et al.*, 2005). Caf4p má stejné doménové složení jako Mdv1p a analogicky hraje roli při intra- a inter-molekulových interakcích. Přesná funkce Fis1p-Caf4p komplexu je zatím nejasná. Na rozdíl od Fis1p-Mdv1p komplexu není tato interakce pro dělení esenciální. Některé studie naznačují důležitost takového komplexu při polarizaci Dnm1p na vnější membráně (Schauss *et al.*, 2006). Další možností je, že k cílení Dnm1p do vnější membrány buňka používá souběžně oba typy interakcí, jak Fis1p-Mdv1p tak Fis1p-Caf4p (Okamoto and Shaw, 2005).

Dnm1p se do vnější mitochondriální membrány dostává i pomocí proteinu Num1. Tato dráha je nezávislá na Fis1p (Cervený *et al.*, 2007a). Num1 je 313kDa velký protein zakotvený do buněčného kortexu svou C-koncovou plextrinovou doménou (Kormanec *et al.*, 1991;Farkasovsky and Kuntzel, 1995). Při absenci Num1 proteinu je mitochondriální dělení utlumeno ale nekompletně přerušeno (Cervený *et al.*, 2007a). Protože jde o poměrně nedávný objev, dosud nebylo zjištěno, jakým mechanismem Num1p mitochondriální dělení ovlivňuje (Lackner and Nunnari, 2008). V souvislosti s Num1 proteinem a mitochondriálním dělením bylo dále zjištěno, že Num1p interaguje s tubulinem, dyneinem a Bni1, který funguje jako nukleátor actinu. Tyto proteiny jsou složky cytoskeletální sítě buňky a interakce s nimi

zaručují spojení komplexu mitochondriálního dělení s cytoskeletem (Farkasovsky and Kuntzel, 2001). Toto spojení může být funkčně důležité pro tvorbu napětí v mitochondriálních tubulech, a tak sloužit k finálnímu oddělení dělicích se membrán mitochondrií (Roux *et al.*, 2006).

U savců byl objeven zatím pouze homolog Fis1, označný jako hFis1p (human Fis1 protein). I hFis1p interaguje s Drp1p na vnější membráně (Yoon *et al.*, 2003), avšak není nezbytný pro jeho mitochondriální lokalizaci (Lee *et al.*, 2004).



Obrázek 4:

Topologie proteinů účastnících se mitochondriálního dělení. Proteiny Mdv1 a Caf4 interagují s proteinem Dnm1 přes WD repeticce, čímž ho udržují v místě dělení. Dále interagují s proteinem Fis1 přes svou N-koncovou doménu (NTE). OM, vnější mitochondriální membrána; IMS, mezimembránový prostor (převzato z Okamoto and Shaw, 2005).

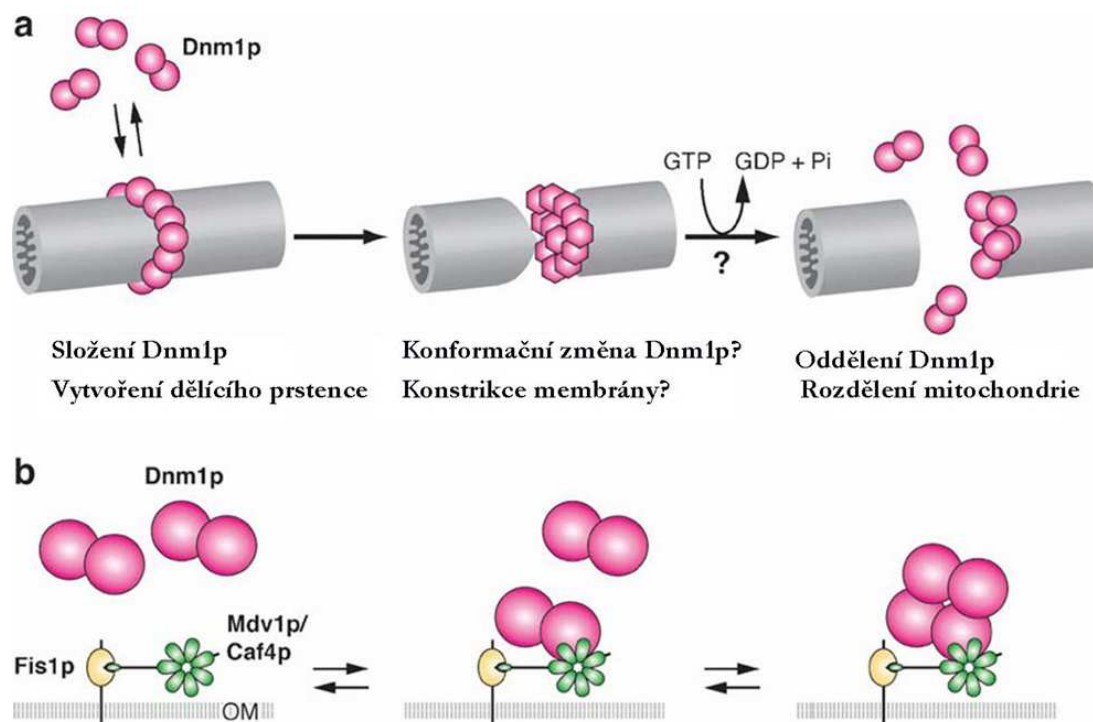
Podle několika studií se zdá, že hFis1p musí být během mitochondriálního dělení přítomný v poměrně přesně daném množství. Při snížené hladině hFis1 je dělení mitochondrií pozastaveno (Suzuki *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004; Stojanovski *et al.*, 2004). Naopak overexprese proteinu vede k rozpadu mitochondriální sítě (James *et al.*, 2003; Stojanovski *et al.*, 2004).

Co se týče kvasinkového Fis1p, není jeho role během procesu dělení doposud objasněna. Zdá se, že během dělení je Fis1p přítomen rovnoměrně po celém povrchu mitochondrie a nedochází k jeho akumulaci přímo v místě dělení, jako je tomu u Mdv1p a Dnm1p (Mozdy *et al.*, 2000; Bhar *et al.*, 2006).

2.2.2 Modely mitochondriálního dělení

V současnosti jsou navrženy dva modely mitochondriálního dělení (Okamoto and Shaw, 2005). V prvním z nich Dnm1p kontinuálně polymeruje a rozpadá se na tzv. “hot spots“ na povrchu mitochondrií díky své schopnosti homo-oligomerizovat a tím tvoří prstence kolem

mitochondriálního tubulu (Obrázek 5a) (Tieu *et al.*, 2002; Shaw and Nunnari, 2002; Osteryoung and Nunnari, 2003). V posledních letech ale vzrůstá obliba modelu regulovaného cílení Dnm1 do vnější mitochondriální membrány pomocí komplexu Fis1/Mdv1/Caf4. Podle tohoto modelu v rané fázi dělení Fis1 navádí Dnm1 pomocí interakcí s Mdv1p a Caf4p na mitochondriální membránu a iniciuje tak jeho polymeraci (Obr. 5b) (Karren *et al.*, 2005). Vztah samotného zaškrcení a oddělení mitochondrie také není dosud zcela objasněn. V některých pracích je uváděno, že konstriktce mitochondriálních tubulů předchází i samotnému nasednutí a polymeraci Dnm1 (Legesse-Miller *et al.*, 2003). Podobně je zvažována i konstriktce mitochondrií v závislosti na interakcích s cytoskeletem pomocí Num1 (Roux *et al.*, 2006).



Obrázek 5:

Modely mitochondriálního dělení pomocí Dnm1p (a) a pomocí interakcí s ostatními proteiny jako jsou Fis1, Mdv1 a Caf4 (b). OM, vnější mitochondriální membrána. Převzato z (Okamoto and Shaw, 2005).

2.2.3 Regulace mitochondriálního dělení

Řada proteinů se přímo či nepřímo podílí na regulaci dělení mitochondrie. Jedná se o různorodé faktory, pro něž mnohdy chybí mechanistické detaily jejich účinku. Zároveň však

poukazují na komplexitu celého procesu a zakotvení mitochondrie do buněčných struktur. Jedním z takových faktorů je protein endofilin B1. Jeho absence vede k propojování mitochondrií (Karbowski *et al.*, 2004), za což je zřejmě odpovědná jeho N-koncová doména, která ovlivňuje zakřivení membrány (Peter *et al.*, 2004; Gallop *et al.*, 2006).

Jako další regulátor mitochondriálního dělení v savčích buňkách byl nedávno identifikován Mff (mitochondrial fission factor) (Gandre-Babbe and van der Bliek, 2008). Jde o protein vnější mitochondriální membrány, do které je zakotven pomocí C-terminální domény. Jeho absence způsobuje útlum mitochondriálního dělení a zdá se, že by mohl hrát roli při sestavování a organizaci dělicích komplexů (Lackner and Nunnari, 2008). GDAP1 a MTP18 jsou další možné regulátory mitochondriálního dělení. Overexprese těchto proteinů ve vnější mitochondriální membráně vede k fragmentaci mitochondriální sítě (Tondera *et al.*, 2005; Niemann *et al.*, 2005).

Za asi nejdůležitější regulační faktory mitochondriálního dělení jsou považovány některé post-translační modifikace proteinů, a to především ubiquitinylace, sumoylace a fosforylace. V této souvislosti je třeba se zmínit o několika proteinech. MARCH5 je E3 ubiquitin ligáza vnější mitochondriální membrány, která přidává ubiquitin k proteinům Drp1 a hFis1 (Nakamura *et al.*, 2006; Yonashiro *et al.*, 2006). a zřejmě tak ovlivňuje jejich stabilitu a aktivitu. Drp1 nepodléhá pouze ubiquitinylaci, ale i sumoylaci a fosforylaci. Zvýšená hladina sumoylace Drp1 zajišťuje jeho lepší stabilitu, což vede k fragmentaci mitochondrií. Zvýšení sumoylace lze dosáhnout overexpresí proteinu SUMO1 nebo deplecí SUMO proteázy (Harder *et al.*, 2004; Zunino *et al.*, 2007).

Fosforylace Drp1 je zajišťována několika různými kinázami, které regulují aktivitu proteinu a jeho distribuci v buňce. Byla identifikována dvě místa, na kterých je Drp1 fosforylován. Jde o Ser585 a Ser637. Ser585 je fosforylován pomocí Cdk1/cyklinB1 (Taguchi *et al.*, 2007). Tato fosforylace zajišťuje spuštění mitochondriálního dělení během mitózy. Ser637 je fosforylován cAMP-dependentní protein kinázou (PKA) a Ca²⁺-calmodulin-dependentní kinázou (CaMK1) (Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007; Han *et al.*, 2008). Význam fosforylace na tomto místě prozatím zůstává neobjasněn. Dvě studie udávají, že fosforylace Ser637 inhibuje mitochondriální dělení. Inhibice by měla být v tomto případě způsobena ztrátou GTPázové aktivity Drp1 nebo zastavením translokace Drp1 do mitochondrie (Chang and Blackstone, 2007; Cribbs and Strack, 2007). Oproti tomuto nedávná práce udává, že tato fosforylace naopak stimuluje jak mitochondriální dělení, tak translokaci Drp1 (Han *et al.*, 2008).

3 Nemoci spojené s defekty v mitochondriální dynamice

Je potřeba si uvědomit, jak je pro buňku důležité udržení rovnováhy v mitochondriální dynamice. U člověka byly dosud objeveny dvě onemocnění týkající se tohoto problému. Jsou to syndrom Charcot-Marie-Tooth a autosomálně dominantní optická atrofie. To ale neznamená, že by rozvrat rovnováhy v mitochondriální dynamice nebyl závažný problém. Právě naopak. Pouze tato dvě onemocnění jsou slučitelná se životem. Mutace v ostatních komponentách se projevují letálním fenotypem již během embryogeneze.

3.1 Autosomálně dominantní optická atrofie

Přímé spojení mezi mitochondriální dynamikou a patogenezí u člověka bylo jako první objeveno v případě autosomálně dominantní optické atrofie (ADOA). Jedná se o dědičnou chorobu postihující gangliové buňky sítnice. Onemocnění vede k postupné ztrátě zraku až k úplnému oslepnutí do dvaceti let života (Delettre *et al.*, 2002). Nemoc je spojená s poškozením genu kódujícího OPA1 protein (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2000).

Mechanismus vedoucí ke ztrátě gangliových buněk sítnice není zatím zcela objasněn. ADOA nicméně vykazuje podobné patofyziologické charakteristiky a příznaky jako Leberova dědičná optická neuropatie (LHON). LHON je onemocnění způsobené mutacemi v genech kódujících mitochondriální komplex I. Důsledkem tohoto onemocnění je nedostatečné generování ATP dýchacím řetězcem mitochondrie (Carelli *et al.*, 2004). V případě redukce OPA1 je přerušena mitochondriální fúze, poškozena struktura mitochondriálních krist a tím i oslabena funkce dýchacího řetězce produkovat ATP (Okamoto and Shaw, 2005). Jako další fakt potvrzující podobnost těchto dvou onemocnění se jeví zvýšená produkce volných kyslíkových radikálů při LHON, což v důsledku vede ke spuštění apoptózy uvnitř poškozených buněk (Carelli *et al.*, 2004). Stejně příznaky, tzn. spuštění apoptózy, vykazují i buňky s deletovaným OPA1 (Olichon *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

3.2 Syndrom Charcot-Marie-Tooth

Charcot-Marie-Tooth neuropatie (CMT) je opět dědičná choroba způsobena mutacemi v genu kódujícím mitofusin Mfn2 (Zuchner *et al.*, 2004; Kijima *et al.*, 2005). Klinické příznaky této choroby jsou oslabení a atrofie distálních svalů, zpomalení nebo úplná absence patelárních reflexů, ztráta citlivosti a deformace chodidel (Shy *et al.*, 1999; Shy, 2004). Zmapované mutace získané sekvenací *MFN2* lokusu u postižených pacientů byly lokalizovány především do GTPázové domény a dvou coiled-coil domén (Zuchner *et al.*, 2004; Kijima *et al.*, 2005). Mutace v GTPázových doménách způsobily ztrátu funkce Mfn2 proteinu (Santel and Fuller,

2001;Eura *et al.*, 2003;Chen *et al.*, 2003), zatímco ztráta coiled-coil domény způsobila mistargetování proteinu a jeho akumulaci v cytoplazmě (Rojo *et al.*, 2002).

Stejně jako v případě autosomálně dominantní optické atrofie, ani zde není přesně popsána patofyziologie onemocnění. Zdá se, že by choroba mohla nějakým způsobem ovlivňovat vesikulární transport jako důsledek nedostatečné produkce ATP (Okamoto and Shaw, 2005).

4 FtsZ protein a dělení mitochondrie

FtsZ je protein vyskytující se téměř ve všech prokaryotických organismech. Strukturálně i evolučně se podobá eukaryotnímu tubulinu a vyskytuje se v cytoplazmě. Při cytokinezi je akumulován v místě dělení, kde vytváří kontraktilní prstenec (Bi and Lutkenhaus, 1991;Bramhill, 1997;Erickson, 1997;Lutkenhaus and Addinall, 1997;Lowe and Amos, 1998). Role FtsZ při dělení organel byla poprvé objevena u *Arabidopsis thaliana*, kde je homolog FtsZ proteinu lokalizován v chloroplastech (Osteryoung and Vierling, 1995). Lokalizace FtsZ homologu v mitochondriích byla poprvé objevena u jednobuněčné řasy *Mallomonas splendens*. Zde byl objeven gen kódující tzv. MsFtsZ-mt (*M. splendens* FtsZ-mitochondria), který se ukázal být příbuzný s FtsZ proteinem alfa-proteobakterií, jenž jsou považovány za předchůdce mitochondrií (Beech *et al.*, 2000). Tento protein obsahuje N-terminální mitochondriální targetovací sekvenci a je tedy do mitochondrií transportován. Při pozorování dělících se mitochondrií je lokalizován především v místě dělení a na okrajích mitochondrií, což odpovídá lokalizaci bakteriálního FtsZ (Beech *et al.*, 2000). Díky těmto pozorováním se dá usuzovat, že MsFtsZ-mt hraje roli při mitochondriálním dělení u *M. splendens*.

Jako další organismy, kde byly mitochondriální homology FtsZ nalezeny, jsou: červená řasa *Cyanidioschyzon meroale* (Takahara *et al.*, 2000), *Dyctiostelium discoideum* (Gilson *et al.*, 2003), centrická rozsivka *Thalassiosira pseudonana* a oomyceta *Phytophthora infestans* (Kiefel *et al.*, 2004).

5 Mitochondriální dělení u parazitických prvoků

O mitochondriálním dělení u parazitických prvoků existuje velmi málo studií. Jediné organismy z této skupiny živočichů, kteří byly ohledně tohoto fenoménu zkoumány, jsou *Toxoplasma gondii* a *Trypanosoma brucei*.

5.1 *Toxoplasma gondii*

Toxoplasma gondii je intracelulární parazit živočichů patřící do říše Chromalveolat, podkmene Apikomplexa. Definitivním hostitelem tohoto parazita jsou výlučně kočkovité šelmy, nicméně jako mezihostitel mu poslouží v podstatě jakýkoli teplokrevný živočich včetně člověka. U lidí způsobuje nemoc zvanou toxoplazmóza.

Mimo ostatní orgány typické pro tyto parazity obsahuje buňka i jednu mitochondrii, která tvoří lasovitou strukturu okolo jádra (Seeber *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2000; Toursel *et al.*, 2000). Díky vytvoření mitochondriálního markeru, fúzí 55 N-terminálních aminokyselin proteinu mitochondriální matrix HSP60 s fluorescenčním proteinem *DsRed* (Toursel *et al.*, 2000), bylo pozorováno mitochondriální dělení *in vivo* (Nishi *et al.*, 2008). V tomto experimentu bylo zjištěno, že, na rozdíl od většiny eukaryot, je mitochondriální segregace u *T. gondii* pevně spjata s buněčným dělením. Na začátku celého procesu na mitochondriích na několika místech vznikají krátké větve, které se postupně prodlužují, až ve finále obklopují vznikající dceřiné buňky. Průnik dceřiných mitochondrií do buněk se děje až v posledním momentu buněčného dělení a samotný proces je velice rychlý. Malá část vznikajících mitochondrií však nepřechází do dceřiných buněk, ale zůstává ve zbytkovém tělísku spolu s ostatními zbytky neinkorporovanými do buněk (Nishi *et al.*, 2008).

Jako další zajímavost mitochondriálního dělení u *T. gondii* byla pozorována interakce mezi mitochondrií a apikoplastem. Tato interakce se však obehuje pouze v určité fázi buněčného cyklu a posléze zaniká (Nishi *et al.*, 2008).

Co se týče mechanismu mitochondriálního dělení, není jasné, jak proces probíhá. Žádné ortology FtsZ proteinu nebyly u *T. gondii* nalezeny. Byly ale objeveny dvě dynaminové GTPázy, které však jsou podle fylogenetických analýz jen vzdáleně příbuzné proteinům Dnm1 nebo Drp1 (Nishi *et al.*, 2008).

5.2 *Trypanosoma brucei*

Trypanosoma brucei je parazitický prvok patřící do skupiny Kinetoplastid. Jedná se o savčího parazita, který využívá hmyzí přenašeče. Nákaza tímto parazitem vyvolává u lidí spavou nemoc, u zvířat nemoc zvanou nagana.

Během svého životního cyklu parazit prochází dvěma stadii vývoje, která se rapidně liší morfologicky a formou metabolismu (Matthews, 1999; Morgan *et al.*, 2002). Nejmarkantnější rozdíly se projevují ve tvaru a funkci mitochondrií (Priest and Hajduk, 1994).

V genomu tohoto prvoka byl nalezen dynaminový protein nazvaný *TbDLP* (Morgan *et al.*, 2004). Jedná se o homolog proteinové rodiny Dnm/Drp dynamin-like proteinů. Pomocí imunofluorescence bylo zjištěno, že protein částečně kolokalizuje s mitochondrií prvoka a je v buňce distribuovaný stejně jako kvasinkový Dnm1p sloužící k dělení mitochondrií. Redukce hladiny *TbDLP* proteinu má silný vliv na mitochondriální dělení a tím samozřejmě i na morfologii mitochondrie (Morgan *et al.*, 2004).

Homology tohoto proteinu byly objeveny i u dalších kinetoplastid, a to u *Leishmania major* a *Trypanosoma vivax* (Morgan *et al.*, 2004). Tyto objevy naznačují, že by se mohlo jednat o evolučně konzervovaný protein kinetoplastid.

Další zvláštností *T. brucei* je fakt, že má mitochondrii fyzicky spojenou s bazálním tělískem bičíku (Robinson and Gull, 1991). Toto spojení je zajištěno mikrotubuly a má za následek, že dělení mitochondrie musí být synchronizováno s dělením bičíku a tím i celé buňky. Aby se buňka mohla rozdělit, musí se nejdříve rozdělit mitochondrie.

6 Hydrogenosomy

Hydrogenosomy jsou většinou kulovité organely buňky vyskytující se u některých amitochondriálních organismů. Jde v podstatě o redukované mitochondrie, z čímhž souvisí i jejich funkce. Slouží jako hlavní energetický aparát buňky. Jedná se převážně o dvojmembránové organely (Benchimol and De, 1983) poprvé popsané u prvoků rodu *Trichomonas* (Lindmark and Muller, 1973). Od té doby byly nalezeny v mnoha dalších organismech, které obývají anaerobní prostředí.

Stejně jako mitochondrie podléhají hydrogenosomy procesu dělení, což bylo poprvé ukázáno na snímcích z transmisního elektronového mikroskopu v roce 1996 (Benchimol *et al.*, 1996). Byly pozorovány dva typy dělení: (i) segmentace, při které se hydrogenosomy prodlužují, uprostřed zužují a následně jsou odděleny mikrofibrilární strukturou, a (ii) přehrazení. Proces přehrazení začíná invaginací vnitřní membrány hydrogenosomu, která postupně tvoří příčné septum a dělí hydrogenosom (Benchimol *et al.*, 1996). Nicméně dosud nebyl odhalen molekulární mechanismus, kterým toto dělení probíhá.

Proces dělení hydrogenosomů byl pozorován také u *Tritrichomonas foetus*, parazitického prvoka urogenitálního traktu skotu. Hydrogenosomy zde byly pozorovány pomocí světelné a transmisní elektronové mikroskopie během buněčného cyklu parazita. Bylo zjištěno, že se hydrogenosomy dělí po celou dobu cyklu nezávisle na sobě. I zde byly pozorovány dva morfologické typy dělení, a to opět segmentace a přehrazení (Benchimol and Engelke, 2003).

Nicméně ani zde nebyl zjišťován mechanismus procesu, tudíž další informace ohledně hydrogenosomálního dělení zatím zůstávají neprozkoumány.

Fúze hydrogenosomů nebyla zatím pozorována.

7 *Giardia intestinalis*

Giardia intestinalis je parazitický prvok z řádu Diplomonadida způsobující průjmová onemocnění obratlovců včetně člověka (Adam, 2001). Má velmi jednoduchý endomembránový systém a chybí jí takové organely jako Golgiho systém nebo peroxisomy (Gaechter *et al.*, 2008). Mitochondrie prošly u *G. intestinalis* dramatickou redukcí až do formy velice jednoduchých kulovitých organel zvaných mitosomy (Tovar *et al.*, 2003). Mitosomy neposkytují žádné ATP a jejich jedinou doposud známou funkcí je syntéza železosírných center (Tovar *et al.*, 2003). Proces dělení či fúze nebyl u mitosomů zatím pozorován. Navíc je pravděpodobné, že jediný homolog dynaminu u *G. intestinalis* se na dělení mitosomů nepodílí (Gaechter *et al.*, 2008).

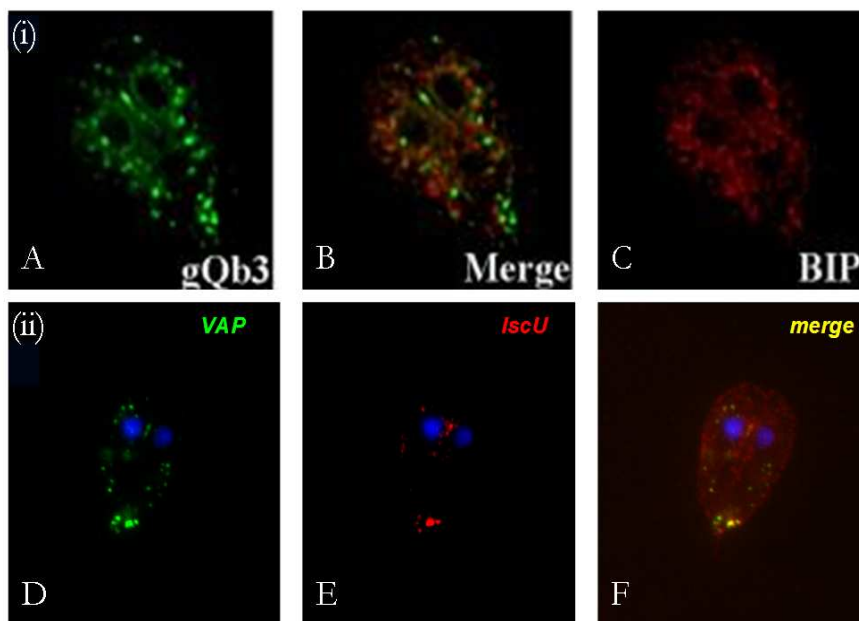
Nedávné objevy ukazují, že biogeneze mitosomů může souviset s endomembránovým systémem *G. intestinalis*. Sekretorický aparát tohoto prvoka je poměrně jednoduchý, a to jak z hlediska genetiky, tak morfologie (Hehl and Marti, 2004). Veškeré sekretorické a endocytické dráhy jsou zde zajišťovány pouze 17 SNARE proteiny, z nichž některé jsou pro buňku esenciální (Elias *et al.*, 2008). SNARE proteiny (soluble NSF attachment protein receptors) (Sollner *et al.*, 1993) obecně zprostředkovávají fúzi váčků uvnitř buněk všech eukaryot (Ferro-Novick and Jahn, 1994) a je na nich postavena endomembránová teorie (Rothman and Warren, 1994).

Naši pozornost upoutay dvě zvláštnosti týkající se distribuce SNARE komplexů v *G. intestinalis*. Jedná se o distribuci proteinů Sec 20 a VAP (VAMP associated protein). Sec20 je typickým SNARE proteinem zajišťujícím transport váčků mezi endoplasmatickým retikulumem a Golgiho systémem (Sweet and Pelham, 1992). VAP promiskuitně interaguje s různými SNARE proteiny a také se účastní membránové fúze (Skehel *et al.*, 1995; Weir *et al.*, 1998; Weir *et al.*, 2001). Navíc obsahuje tubulin-vazebnou doménu, která zajišťuje jeho interakci s mikrotubuly (Pennetta *et al.*, 2002). Zvláštností u *G. intestinalis* je lokalizace těchto dvou proteinů v mitosomech (Elias *et al.*, 2008) (VAP – nepublikováno, výsledek laboratoře Prof. Tachezyho) (Obrázek 6). Tato lokalizace je překvapivá i proto, že, až na výjimky (Isenmann *et al.*, 1998; Jagerstrom *et al.*, 2009), se SNARE proteiny v buňce podílí

na proteinovém transportu mezi organelami endomembránového systému, kam mitochondrie nepatří.

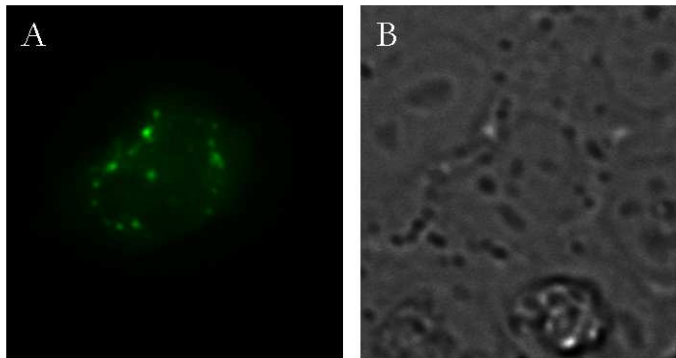
Díky těmto objevům vyvstávají otázky ohledně začlenění mitochondrie do endomembránového systému buňky. Využívají mitosomy ke své biogenezi SNARE proteiny? Mohou mitochondrie fúzovat se sekrečními váčky pomocí SNARE proteinů? Mohou díky SNARE proteinům nějakým způsobem interagovat s cytoskeletem?

Odpovédím na tyto otázky se pokusím přiblížit ve své diplomové práci, která bude tímto směrem zaměřena. Prozatimní výsledky ukazují lokalizaci VAP proteinu v mitosomech (Obr. 6D). V dalším pokusu jsme Sec20 proteinem *G. intestinalis* transformovali savčí HeLa buňky (Obrázek 7). Sec20 protein byl zfúzován s GFP proteinem na svém N-konci. Jako vektor byl použit pEGFP-C1. Ukázalo se, že protein z *G. intestinalis* není lokalizován v mitochondriích HeLa buněk, nýbrž v kulovitých strukturách v okolí jader, nejspíš lysozomech (Obr. 7A). Z toho vyplývá, že mitosomální targetovací sekvence *G. intestinalis* nestačí k targetování proteinů do mitochondrií. Oba typy organel tudíž vyžadují jiné targetovací sekvence a tyto se nemohou vzájemně nahradit.



Obrázek 6:

Lokalizace dvou SNARE proteinů *Giardia intestinalis*. (i), lokalizace homologu Sec20 proteinu (převzato z Elias et al., 2008); (ii), lokalizace VAP proteinu; A, homolog Sec20 proteinu; B, překryv A a C; C, marker endoplasmatického retikula; D, VAP protein; E, mitosomální marker; F, překryv D a E.



Obrázek 7:

Lokalizace Sec20 proteinu Giardia intestinalis v savčích HeLa buňkách. A, protein fúzovaný s GFP; B, Nomarskyho diferenciální kontrast.

8 Závěr a hodnocení

Práce dokumentuje současný stav poznatků týkajících se především mitochondriální dynamiky u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* a u člověka a mitochondriálního dělení u parazitických prvoků. Existence dvou závažných lidských onemocnění poukazuje na to, že další studium mitochondriální dynamiky je jistě nejen zajímavé, nicméně i velmi důležité.

Práce také poukazuje na fakt, že stále existuje spousta neznámých informací týkajících se nejen biogeneze mitochondrií, ale především organel příbuzných mitochondrii, tedy hydrogenosomů a mitosomů. Zároveň by měla sloužit jako podklad k mé budoucí diplomové práci.

9 Seznam literatury

Adam,R.D. (2001). Biology of *Giardia lamblia*. Clin. Microbiol. Rev. 14, 447-475.

Alexander,C., Votruba,M., Pesch,U.E., Thiselton,D.L., Mayer,S., Moore,A., Rodriguez,M., Kellner,U., Leo-Kottler,B., Auburger,G., Bhattacharya,SS., Wissinger,B. (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. Nat. Genet. 26, 211-215.

Attardi,G. and Schatz,G. (1988). Biogenesis of mitochondria. Annu. Rev. Cell Biol. 4, 289-333.

- Beech,P.L., Nheu,T., Schultz,T., Herbert,S., Lithgow,T., Gilson,P.R., and McFadden,G.I. (2000). Mitochondrial FtsZ in a chromophyte alga. *Science* 287, 1276-1279.
- Benchimol,M. and De,S.W. (1983). Fine structure and cytochemistry of the hydrogenosome of *Tritrichomonas foetus*. *J. Protozool.* 30, 422-425.
- Benchimol,M. and Engelke,F. (2003). Hydrogenosome behavior during the cell cycle in *Tritrichomonas foetus*. *Biol. Cell* 95, 283-293.
- Benchimol,M., Johnson,P.J., and De,S.W. (1996). Morphogenesis of the hydrogenosome: an ultrastructural study. *Biol. Cell* 87, 197-205.
- Bhar,D., Karren,M.A., Babst,M., and Shaw,J.M. (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J. Biol. Chem.* 281, 17312-17320.
- Bi,E.F. and Lutkenhaus,J. (1991). FtsZ ring structure associated with division in *Escherichia coli*. *Nature* 354, 161-164.
- Bramhill,D. (1997). Bacterial cell division. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 13, 395-424.
- Carelli,V., Rugolo,M., Sgarbi,G., Ghelli,A., Zanna,C., Baracca,A., Lenaz,G., Napoli,E., Martinuzzi,A., and Solaini,G. (2004). Bioenergetics shapes cellular death pathways in Leber's hereditary optic neuropathy: a model of mitochondrial neurodegeneration. *Biochim. Biophys. Acta* 1658, 172-179.
- Cervený,K.L. and Jensen,R.E. (2003). The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 14, 4126-4139.
- Cervený,K.L., Studer,S.L., Jensen,R.E., and Sesaki,H. (2007a). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev. Cell* 12, 363-375.
- Cervený,K.L., Tamura,Y., Zhang,Z., Jensen,R.E., and Sesaki,H. (2007b). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol.* 17, 563-569.
- Chan,D.C. (2006). Dissecting mitochondrial fusion. *Dev. Cell* 11, 592-594.
- Chang,C.R. and Blackstone,C. (2007). Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J. Biol. Chem.* 282, 21583-21587.
- 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.
- Cipolat,S., Rudka,T., Hartmann,D., Costa,V., Serneels,L., Craessaerts,K., Metzger,K., Frezza,C., Annaert,W., D'Adamio,L., Derks,C., Dejaegere,T., Pellegrini,L., D'Hooge,R., Scorrano,L., De Strooper,B. (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163-175.
- Coonrod,E.M., Karren,M.A., and Shaw,J.M. (2007). Ugo1p is a multipass transmembrane protein with a single carrier domain required for mitochondrial fusion. *Traffic.* 8, 500-511.

- Cribbs,J.T. and Strack,S. (2007). Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 8, 939-944.
- Danial,N.N. and Korsmeyer,S.J. (2004). Cell death: critical control points. *Cell* 116, 205-219.
- de Brito,O.M. and Scorrano,L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.
- Delettre,C. *et al.* (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207-210.
- Delettre,C., Lenaers,G., Pelloquin,L., Belenguer,P., and Hamel,C.P. (2002). OPA1 (Kjer type) dominant optic atrophy: a novel mitochondrial disease. *Mol. Genet. Metab* 75, 97-107.
- Delivani,P., Adrain,C., Taylor,R.C., Duriez,P.J., and Martin,S.J. (2006). Role for CED-9 and Egl-1 as regulators of mitochondrial fission and fusion dynamics. *Mol. Cell* 21, 761-773.
- Dohm,J.A., Lee,S.J., Hardwick,J.M., Hill,R.B., and Gittis,A.G. (2004). Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins* 54, 153-156.
- Duvezin-Caubet,S., Koppen,M., Wagener,J., Zick,M., Israel,L., Bernacchia,A., Jagasia,R., Rugarli,EL., Imhof,A., Neupert,W., Langer,T., Reichert,A.S. (2007). OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 18, 3582-3590.
- Elias,E.V., Quiroga,R., Gottig,N., Nakanishi,H., Nash,T.E., Neiman,A., and Lujan,H.D. (2008). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 283, 35996-36010.
- Erickson,H.P. (1997). FtsZ, a tubulin homologue in prokaryote cell division. *Trends Cell Biol.* 7, 362-367.
- Escobar-Henriques,M. and Langer,T. (2006). Mitochondrial shaping cuts. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 422-429.
- Eura,Y., Ishihara,N., Oka,T., and Mihara,K. (2006). Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J. Cell Sci.* 119, 4913-4925.
- Eura,Y., Ishihara,N., Yokota,S., and Mihara,K. (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J. Biochem.* 134, 333-344.
- Farkasovsky,M. and Kuntzel,H. (2001). Cortical Num1p interacts with the dynein intermediate chain Pac11p and cytoplasmic microtubules in budding yeast. *J. Cell Biol.* 152, 251-262.
- Farkasovsky,M. and Kuntzel,H. (1995). Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J. Cell Biol.* 131, 1003-1014.
- Ferro-Novick,S. and Jahn,R. (1994). Vesicle fusion from yeast to man. *Nature* 370, 191-193.

- 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., Scorrano, L. *Cell* 126, 177-189.
- Fritz, S., Rapaport, D., Klanner, E., Neupert, W., and Westermann, B. (2001). Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J. Cell Biol.* 152, 683-692.
- Fritz, S., Weinbach, N., and Westermann, B. (2003). Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol. Biol. Cell* 14, 2303-2313.
- Gaechter, V., Schraner, E., Wild, P., and Hehl, A.B. (2008). The single dynamin family protein in the primitive protozoan *Giardia lamblia* is essential for stage conversion and endocytic transport. *Traffic* 9, 57-71.
- Gallop, J.L., Jao, C.C., Kent, H.M., Butler, P.J., Evans, P.R., Langen, R., and McMahon, H.T. (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *EMBO J.* 25, 2898-2910.
- Gandre-Babbe, S. and van der Blik, A.M. (2008). The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* 19, 2402-2412.
- Gilson, P.R., Yu, X.C., Hereld, D., Barth, C., Savage, A., Kiefel, B.R., Lay, S., Fisher, P.R., Margolin, W., and Beech, P.L. (2003). Two *Dictyostelium* orthologs of the prokaryotic cell division protein FtsZ localize to mitochondria and are required for the maintenance of normal mitochondrial morphology. *Eukaryot. Cell* 2, 1315-1326.
- Griffin, E.E. and Chan, D.C. (2006). Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* 281, 16599-16606.
- Griffin, E.E., Graumann, J., and Chan, D.C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* 170, 237-248.
- Griparic, L., Kanazawa, T., and van der Blik, A.M. (2007). Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* 178, 757-764.
- Griparic, L. and van der Blik, A.M. (2001). The many shapes of mitochondrial membranes. *Traffic* 2, 235-244.
- Griparic, L., van der Wel, N.N., Orozco, I.J., Peters, P.J., and van der Blik, A.M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 18792-18798.
- Guillou, E., Bousquet, C., Daloyau, M., Emorine, L.J., and Belenguer, P. (2005). Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Lett.* 579, 1109-1116.
- Hales, K.G. and Fuller, M.T. (1997). Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90, 121-129.

- Han,X.J., Lu,Y.F., Li,S.A., Kaitsuka,T., Sato,Y., Tomizawa,K., Nairn,A.C., Takei,K., Matsui,H., and Matsushita,M. (2008). CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* *182*, 573-585.
- Harder,Z., Zunino,R., and McBride,H. (2004). Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr. Biol.* *14*, 340-345.
- Hehl,A.B. and Marti,M. (2004). Secretory protein trafficking in *Giardia intestinalis*. *Mol. Microbiol.* *53*, 19-28.
- Herlan,M., Bornhovd,C., Hell,K., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2004). Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* *165*, 167-173.
- Hermann,G.J., Thatcher,J.W., Mills,J.P., Hales,K.G., Fuller,M.T., Nunnari,J., and Shaw,J.M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* *143*, 359-373.
- Hinshaw,J.E. (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* *16*, 483-519.
- Hoppins,S., Lackner,L., and Nunnari,J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* *76*, 751-780.
- Ingerman,E., Perkins,E.M., Marino,M., Mears,J.A., McCaffery,J.M., Hinshaw,J.E., and Nunnari,J. (2005). Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J. Cell Biol.* *170*, 1021-1027.
- Isenmann,S., Khew-Goodall,Y., Gamble,J., Vadas,M., and Wattenberg,B.W. (1998). A splice-isoform of vesicle-associated membrane protein-1 (VAMP-1) contains a mitochondrial targeting signal. *Mol. Biol. Cell* *9*, 1649-1660.
- Ishihara,N., Eura,Y., and Mihara,K. (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J. Cell Sci.* *117*, 6535-6546.
- Ishihara,N., Fujita,Y., Oka,T., and Mihara,K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* *25*, 2966-2977.
- Ishihara,N., Jofuku,A., Eura,Y., and Mihara,K. (2003). Regulation of mitochondrial morphology by membrane potential, and DRP1-dependent division and FZO1-dependent fusion reaction in mammalian cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *301*, 891-898.
- Jagerstrom,S., Polesie,S., Wickstrom,Y., Johansson,B.R., Schroder,H.D., Hojlund,K., and Bostrom,P. (2009). Lipid droplets interact with mitochondria using SNAP23. *Cell Biol. Int.*
- 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.
- Karbowski,M., Jeong,S.Y., and Youle,R.J. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* *166*, 1027-1039.

- 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.
- Karren,M.A., Coonrod,E.M., Anderson,T.K., and Shaw,J.M. (2005). The role of Fis1p-Mdv1p interactions in mitochondrial fission complex assembly. *J. Cell Biol.* 171, 291-301.
- Kiefel,B.R., Gilson,P.R., and Beech,P.L. (2004). Diverse eukaryotes have retained mitochondrial homologues of the bacterial division protein FtsZ. *Protist.* 155, 105-115.
- Kijima,K., Numakura,C., Izumino,H., Umetsu,K., Nezu,A., Shiiki,T., Ogawa,M., Ishizaki,Y., Kitamura,T., Shozawa,Y., Hayasaka,K. (2005). Mitochondrial GTPase mitofusin 2 mutation in Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Hum. Genet.* 116, 23-27.
- Kormanec,J., Schaaff-Gerstenschlager,I., Zimmermann,F.K., Perecko,D., and Kuntzel,H. (1991). Nuclear migration in *Saccharomyces cerevisiae* is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol. Gen. Genet.* 230, 277-287.
- Koshiha,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.
- Lackner,L.L. and Nunnari,J.M. (2008). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta.*
- 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 Opal in apoptosis. *Mol. Biol. Cell* 15, 5001-5011.
- Legesse-Miller,A., Massol,R.H., and Kirchhausen,T. (2003). Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol. Biol. Cell* 14, 1953-1963.
- Legros,F., Lombes,A., Frachon,P., and Rojo,M. (2002). Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol. Biol. Cell* 13, 4343-4354.
- Lindmark,D.G. and Muller,M. (1973). Hydrogenosome, a cytoplasmic organelle of the anaerobic flagellate *Trichomonas foetus*, and its role in pyruvate metabolism. *J. Biol. Chem.* 248, 7724-7728.
- Lowe,J. and Amos,L.A. (1998). Crystal structure of the bacterial cell-division protein FtsZ. *Nature* 391, 203-206.
- Lutkenhaus,J. and Addinall,S.G. (1997). Bacterial cell division and the Z ring. *Annu. Rev. Biochem.* 66, 93-116.
- Mattenberger,Y., James,D.I., and Martinou,J.C. (2003). Fusion of mitochondria in mammalian cells is dependent on the mitochondrial inner membrane potential and independent of microtubules or actin. *FEBS Lett.* 538, 53-59.
- Matthews,K.R. (1999). Developments in the differentiation of *Trypanosoma brucei*. *Parasitol. Today* 15, 76-80.

- Meeusen,S., DeVay,R., Block,J., Cassidy-Stone,A., Wayson,S., McCaffery,J.M., and Nunnari,J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127, 383-395.
- Melo,E.J., Attias,M., and De,S.W. (2000). The single mitochondrion of tachyzoites of *Toxoplasma gondii*. *J. Struct. Biol.* 130, 27-33.
- Morgan,G.W., Goulding,D., and Field,M.C. (2004). The single dynamin-like protein of *Trypanosoma brucei* regulates mitochondrial division and is not required for endocytosis. *J. Biol. Chem.* 279, 10692-10701.
- Morgan,G.W., Hall,B.S., Denny,P.W., Field,M.C., and Carrington,M. (2002). The endocytic apparatus of the kinetoplastida. Part II: machinery and components of the system. *Trends Parasitol.* 18, 540-546.
- Mozdy,A.D., McCaffery,J.M., and Shaw,J.M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* 151, 367-380.
- Nakamura,N., Kimura,Y., Tokuda,M., Honda,S., and Hirose,S. (2006). MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep.* 7, 1019-1022.
- Naylor,K., Ingerman,E., Okreglak,V., Marino,M., Hinshaw,J.E., and Nunnari,J. (2006). Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J. Biol. Chem.* 281, 2177-2183.
- Niemann,A., Ruegg,M., La,P., V, Schenone,A., and Suter,U. (2005). Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J. Cell Biol.* 170, 1067-1078.
- Nishi,M., Hu,K., Murray,J.M., and Roos,D.S. (2008). Organellar dynamics during the cell cycle of *Toxoplasma gondii*. *J. Cell Sci.* 121, 1559-1568.
- Okamoto,K. and Shaw,J.M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* 39, 503-536.
- Olichon,A., Baricault,L., Gas,N., Guillou,E., Valette,A., Belenguer,P., and Lenaers,G. (2003). Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J. Biol. Chem.* 278, 7743-7746.
- Osteryoung,K.W. and Nunnari,J. (2003). The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302, 1698-1704.
- Osteryoung,K.W. and Vierling,E. (1995). Conserved cell and organelle division. *Nature* 376, 473-474.
- Otsuga,D., Keegan,B.R., Brisch,E., Thatcher,J.W., Hermann,G.J., Bleazard,W., and Shaw,J.M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* 143, 333-349.

- Pelloquin,L., Belenguer,P., Menon,Y., and Ducommun,B. (1998). Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *251*, 720-726.
- Pelloquin,L., Belenguer,P., Menon,Y., Gas,N., and Ducommun,B. (1999). Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin-related protein. *J. Cell Sci.* *112* (Pt 22), 4151-4161.
- Pennetta,G., Hiesinger,P.R., Fabian-Fine,R., Meinertzhagen,I.A., and Bellen,H.J. (2002). *Drosophila* VAP-33A directs bouton formation at neuromuscular junctions in a dosage-dependent manner. *Neuron* *35*, 291-306.
- Peter,B.J., Kent,H.M., Mills,I.G., Vallis,Y., Butler,P.J., Evans,P.R., and McMahon,H.T. (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* *303*, 495-499.
- Praefcke,G.J. and McMahon,H.T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *5*, 133-147.
- Priest,J.W. and Hajduk,S.L. (1994). Developmental regulation of mitochondrial biogenesis in *Trypanosoma brucei*. *J. Bioenerg. Biomembr.* *26*, 179-191.
- Rapaport,D., Brunner,M., Neupert,W., and Westermann,B. (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *273*, 20150-20155.
- Robinson,D.R. and Gull,K. (1991). Basal body movements as a mechanism for mitochondrial genome segregation in the trypanosome cell cycle. *Nature* *352*, 731-733.
- Rojo,M., Legros,F., Chateau,D., and Lombes,A. (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J. Cell Sci.* *115*, 1663-1674.
- Rothman,J.E. and Warren,G. (1994). Implications of the SNARE hypothesis for intracellular membrane topology and dynamics. *Curr. Biol.* *4*, 220-233.
- Roux,A., Uyhazi,K., Frost,A., and De,C.P. (2006). GTP-dependent twisting of dynamin implicates constriction and tension in membrane fission. *Nature* *441*, 528-531.
- Santel,A. and Fuller,M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* *114*, 867-874.
- Schauss,A.C., Bewersdorf,J., and Jakobs,S. (2006). Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J. Cell Sci.* *119*, 3098-3106.
- Seeber,F., Ferguson,D.J., and Gross,U. (1998). *Toxoplasma gondii*: a paraformaldehyde-insensitive diaphorase activity acts as a specific histochemical marker for the single mitochondrion. *Exp. Parasitol.* *89*, 137-139.
- Sesaki,H., Dunn,C.D., Iijima,M., Shepard,K.A., Yaffe,M.P., Machamer,C.E., and Jensen,R.E. (2006). Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J. Cell Biol.* *173*, 651-658.

- Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* *152*, 1123-1134.
- Sesaki,H. and Jensen,R.E. (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* *279*, 28298-28303.
- Sesaki,H., Southard,S.M., Yaffe,M.P., and Jensen,R.E. (2003). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* *14*, 2342-2356.
- Shaw,J.M. and Nunnari,J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* *12*, 178-184.
- Shepard,K.A. and Yaffe,M.P. (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J. Cell Biol.* *144*, 711-720.
- Shy,M.E. (2004). Charcot-Marie-Tooth disease: an update. *Curr. Opin. Neurol.* *17*, 579-585.
- Shy,M.E., Kamholz,J., and Lovelace,R.E. (1999). Introduction to the Third International Symposium on Charcot-Marie-Tooth disorders. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *883*, xiii-xviii.
- Skehel,P.A., Martin,K.C., Kandel,E.R., and Bartsch,D. (1995). A VAMP-binding protein from *Aplysia* required for neurotransmitter release. *Science* *269*, 1580-1583.
- Smirnova,E., Griparic,L., Shurland,D.L., and van der Blik,A.M. (2001). Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* *12*, 2245-2256.
- Smirnova,E., Shurland,D.L., Newman-Smith,E.D., Pishvae,B., and van der Blik,A.M. (1999). A model for dynamin self-assembly based on binding between three different protein domains. *J. Biol. Chem.* *274*, 14942-14947.
- Sollner,T., Whiteheart,S.W., Brunner,M., Erdjument-Bromage,H., Geromanos,S., Tempst,P., and Rothman,J.E. (1993). SNAP receptors implicated in vesicle targeting and fusion. *Nature* *362*, 318-324.
- Song,Z., Chen,H., Fiket,M., Alexander,C., and Chan,D.C. (2007). OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* *178*, 749-755.
- Stojanovski,D., Koutsopoulos,O.S., Okamoto,K., and Ryan,M.T. (2004). Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J. Cell Sci.* *117*, 1201-1210.
- Suzuki,M., Jeong,S.Y., Karbowski,M., Youle,R.J., and Tjandra,N. (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J. Mol. Biol.* *334*, 445-458.
- Suzuki,M., Neutzner,A., Tjandra,N., and Youle,R.J. (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* *280*, 21444-21452.

- Sweet,D.J. and Pelham,H.R. (1992). The *Saccharomyces cerevisiae* SEC20 gene encodes a membrane glycoprotein which is sorted by the HDEL retrieval system. *EMBO J.* *11*, 423-432.
- Taguchi,N., Ishihara,N., Jofuku,A., Oka,T., and Mihara,K. (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J. Biol. Chem.* *282*, 11521-11529.
- Takahara,M., Takahashi,H., Matsunaga,S., Miyagishima,S., Takano,H., Sakai,A., Kawano,S., and Kuroiwa,T. (2000). A putative mitochondrial ftsZ gene is present in the unicellular primitive red alga *Cyanidioschyzon merolae*. *Mol. Gen. Genet.* *264*, 452-460.
- Tieu,Q. and Nunnari,J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* *151*, 353-366.
- Tieu,Q., Okreglak,V., Naylor,K., and Nunnari,J. (2002). The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J. Cell Biol.* *158*, 445-452.
- Tondera,D., Czauderna,F., Paulick,K., Schwarzer,R., Kaufmann,J., and Santel,A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.* *118*, 3049-3059.
- Toursel,C., Dzierszynski,F., Bernigaud,A., Mortuaire,M., and Tomavo,S. (2000). Molecular cloning, organellar targeting and developmental expression of mitochondrial chaperone HSP60 in *Toxoplasma gondii*. *Mol. Biochem. Parasitol.* *111*, 319-332.
- Tovar,J., Leon-Avila,G., Sanchez,L.B., Sutak,R., Tachezy,J., van der,G.M., Hernandez,M., Muller,M., and Lucocq,J.M. (2003). Mitochondrial remnant organelles of *Giardia* function in iron-sulphur protein maturation. *Nature* *426*, 172-176.
- van der Blik,A.M. (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol.* *9*, 96-102.
- Vogel,F., Bornhovd,C., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* *175*, 237-247.
- Weir,M.L., Klip,A., and Trimble,W.S. (1998). Identification of a human homologue of the vesicle-associated membrane protein (VAMP)-associated protein of 33 kDa (VAP-33): a broadly expressed protein that binds to VAMP. *Biochem. J.* *333* (Pt 2), 247-251.
- Weir,M.L., Xie,H., Klip,A., and Trimble,W.S. (2001). VAP-A binds promiscuously to both v- and tSNAREs. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *286*, 616-621.
- Wong,E.D., Wagner,J.A., Scott,S.V., Okreglak,V., Holewinski,T.J., Cassidy-Stone,A., and Nunnari,J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* *160*, 303-311.
- Yonashiro,R., Ishido,S., Kyo,S., Fukuda,T., Goto,E., Matsuki,Y., Ohmura-Hoshino,M., Sada,K., Hotta,H., Yamamura,H., Inatome,R., Yanagi,S. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* *25*, 3618-3626.

Yoon,Y., Krueger,E.W., Oswald,B.J., and McNiven,M.A. (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol. Cell Biol.* 23, 5409-5420.

Youle,R.J. and Karbowski,M. (2005). Mitochondrial fission in apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 6, 657-663.

Züchner,S., Mersiyanova,I.V., Muglia,M., Bissar-Tadmouri,N., Rochelle,J., Dadali,E.L., Zappia,M., Nelis,E., Patitucci,A., Senderek,J., Parman,Y., Evgrafov,O., Jonghe,P.D., Takahashi,Y., Tsuji,S., Pericak-Vance,M.A., Quattrone,A., Battaloglu,E., Polyakov,A.V., Timmerman,V., Schröder,J.M., Vance,J.M. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* 36, 449-451.

Zunino,R., Schauss,A., Rippstein,P., Andrade-Navarro,M., and McBride,H.M. (2007). The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J. Cell Sci.* 120, 1178-1188.