

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Katedra parazitologie



Luboš Voleman

Úloha SNARE proteinů v biogenezi mitosomů

Giardia intestinalis

The role of a SNARE proteins in the biogenesis of *Giardia intestinalis*
mitosomes

DIPLOMOVÁ PRÁCE

Vedoucí práce: Mgr. Pavel Doležal, PhD

Praha, 2011

Prohlašuji, že jsem zadanou Diplomovou práci vypracoval samostatně a že jsem uvedl veškeré použité informační zdroje. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne 17.8.2011

.....

Mé nesmírné díky patří především mému školiteli Pavlovi Doležalovi za jeho vedení, pomoc, rady, a neutuchající důvěru ve mě. Bez jeho podpory by tato práce nikdy nemohla vzniknout. Dále pak Míše Marcinčikové, bez které by naše laboratoř nejspíš zkolabovala, Honzovi Pyrihovi za pomoc s metodikou a celému osazenstvu laboratoře za podporu a příjemnou pracovní atmosféru. Dále bych rád poděkoval Kláře Jirákové za pomoc při práci s cystami *G. intestinalis*. Veliké díky patří také mým rodičům za jejich celoživotní podporu a porozumění, mé přítelkyni za velikou trpělivost a mým přátelům za nevědecký přístup k mé práci. V neposlední řadě chci také poděkovat Josefu Zvěřinovi za veškerou poskytnutou pomoc jak během mého studia, tak v životě. Všem výše zmíněným patří můj obrovský dík!

1 Úvod	6
2 Literární přehled	7
2.1 SNARE proteiny	7
2.1.1 Historie objevu SNARE proteinů.....	7
2.1.2 Struktura SNARE proteinů.....	7
2.1.3 SNARE proteiny a membránová fúze	8
2.2 Mitochondriální fúze	10
2.2.1. Fzo1p	11
2.2.2. Mgm1p	12
2.2.2.1 <i>Mgm1p a morfologie mitochondriálních krist</i>	13
2.2.3 Ugo1p	13
2.2.4 Modely mitochondriální fúze	14
2.3 <i>Giardia intestinalis</i>	15
2.4 Kompartmentalizace mRNA	17
3 Cíle práce	19
4 Materiál a metody	20
4.1 Buněčné kultury	20
4.1.1 <i>Giardia intestinalis</i>	20
4.1.2 <i>Escherichia coli</i>	20
4.1.3 <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
4.2 Plazmidy	21
4.2.1 Expresní plazmid pET-42b.....	21
4.2.3 pOCT-PP2Aas	22
4.2.4 Plazmid pUG36	22
4.3 Amplifikace genů	23
4.4 Izolace a klonování DNA fragmentů	25
4.5 Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu protilátky	26

4.5.1	Expresa proteinu	26
4.5.2	Izolace a purifikace proteinu	27
4.6	Transfekce buněk <i>Giardia intestinalis</i>	27
4.7	Transfekce buněk <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	28
4.8	Fluorescenční mikroskopie	28
4.8.1	Příprava preparátů trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	29
4.8.2	Fluorescenční značení trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	29
4.8.3	Fluorescenční značení cyst <i>G. intestinalis</i>	30
4.8.4	Příprava preparátů a značení buněk <i>S. cerevisiae</i>	30
4.9	Hrubá frakcionace trofozoitů <i>G. intestinalis</i>	31
5	Výsledky	32
5.1	Lokalizace <i>GiSec20</i> v trofozoitech <i>G. Intestinalis</i>	32
5.1.1	Expresa rekombinantního proteinu v <i>E. coli</i>	32
5.1.2	Testování protilátky	33
5.1.3	Overexpresa <i>GiSec20</i>	34
5.2	Targetovací informace proteinu <i>GiSec20</i>	40
5.2.1	Bioinformatická analýza <i>GiSec20</i>	40
5.2.2	Ověření targetovací funkce transmembránové domény <i>GiSec20</i>	40
5.2.2.1	Targetovací funkce TMD <i>GiSec20</i> v <i>G. intestinalis</i>	41
5.2.2.2	Targetovací funkce TMD <i>GiSec20</i> v <i>S. cerevisiae</i>	42
5.3	Overexpresa <i>GiSec20</i> s přirozenou 3'UTR.....	43
5.4	Lokalizace <i>GiSec20</i> v cystách <i>G. intestinalis</i>	45
6	Diskuze	47
6.1	Sec20 <i>Giardia intestinalis</i>	47
6.2	Buněčná lokalizace <i>GiSec20</i>.....	47
6.3	Targetovací informace <i>GiSec20</i>.....	48
6.4	Změna lokalizace <i>GiSec20</i> při overexpresi.....	48

6.5 Zvýšení hladiny exprese <i>GiSec20</i> způsobuje agregaci/fúzi buněčných kompartmentů	50
7 Závěr	51
8 Seznam zkratek	52
9 Seznam použité literatury.....	54

1 Úvod

SNARE proteiny jsou esenciální pro všechny membránové fúze, které probíhají uvnitř eukaryotických buněk napříč sekretorickými a endocytickými drahami. Pouze u organel, které leží mimo tyto dráhy, tedy mitochondrií a plastidů, byly během evoluce vyvinuty speciální procesy, díky kterým je jejich fúze nezávislá na SNARE proteinech. SNARE proteiny byly objeveny u všech zatím zkoumaných eukaryotických organismů, což, vezmeme-li v potaz jejich funkci, není nijak překvapivé.

Giardia intestinalis je mikroaerofilní bičíkovec parazitující v zažívací soustavě obratlovců včetně člověka, kde může způsobit vážná průjmová onemocnění. Jedná se o prvoka ze skupiny organismů, která se z eukaryotické linie oddělila pravděpodobně již velmi dávno a je tedy významným modelovým systémem z hlediska evoluce eukaryot.

Mitochondrie jsou u *G. intestinalis* významným způsobem redukovány do formy dvoumembránových organel, tzv. mitosomů. Mitosomy nevytvářejí ATP a chybí jim typické mitochondriální krysty. Jedinou dosud popsanou funkcí mitosomů je jejich podíl na syntéze Fe-S center. Také endomembránový systém *G. intestinalis* je velice zjednodušen, a to až do takové míry, že zde například strukturně zcela chybí Golgiho aparát. Nicméně i v takto zjednodušené formě endomembránového systému bylo nalezeno několik SNARE proteinů. U jednoho z nich byla publikována mitosomální lokalizace, která je u tohoto typu proteinů naprosto unikátní. Právě tato atypická lokalizace nás vedla k podrobnějšímu zkoumání proteinu a snaže zjistit jeho funkci v biogenezi mitosomů.

2 Literární přehled

Literární přehled byl částečně převzat z mé bakalářské práce, doplněn o nejnovější poznatky a dále rozšířen.

2.1 SNARE proteiny

2.1.1 Historie objevu SNARE proteinů

Historie objevu SNARE proteinů sahá do 80. let 20. století. V roce 1984 se při snaze o zavedení “cell-free“ systému pro zkoumání proteinového transportu podařilo purifikovat z povrchových membrán Golgiho aparátu dva proteiny (Balch *et al.*, 1984), později nazvané NSF (N-ethylmaleimid sensitive factor) (Block *et al.*, 1988) a SNAP (NSF attachment protein) (Clary *et al.*, 1990). Tyto proteiny byly dále použity k afinitní purifikaci vazebných partnerů (Sollner *et al.*, 1993). Na základě předpokladu, že se jedná o receptory, vznikl jejich název, tedy SNARE (soluble N-ethylmaleimid-sensitive factor attachment protein receptors) proteiny.

2.1.2 Struktura SNARE proteinů

Pro všechny SNARE proteiny je typické, že obsahují tzv. SNARE motiv, což je solubilní coiled-coil doména tvořená α -helixem složeným z evolučně konzervovaných sedmičlenných repetitiv, které jsou vysoce hydrofobní (Weimbs *et al.*, 1998). Tato struktura je natolik evolučně konzervovaná, že se pravděpodobně vyvinula u společného předka všech eukaryot a uchovala se ve více méně nezměněné podobě dodnes (Weimbs *et al.*, 1998). Hydrofobní charakter SNARE motivu je v centrální části, tzv. nulové vrstvě, narušen přítomností kladně nabitých aminokyselin, glutaminu nebo argininu (Sutton *et al.*, 1998). Ačkoli je přítomnost glutaminu, příp. argininu také velice konzervovaná, nemusí se vždy jednat o tyto konkrétní aminokyseliny. Na základě tohoto objevu bylo upraveno názvosloví SNARE proteinů z původních v- a t-SNARE (Sollner *et al.*, 1993), které proteiny dělilo podle toho, zda jsou přítomny na membráně vakuoly (v-SNARE) nebo na cílové membráně (t-SNARE), na dnešní R- a Q-SNARE (Fasshauer *et al.*, 1998). Novější názvosloví proteiny dělí podle charakteru přítomné aminokyseliny v “nulové vrstvě“. Skupina Q-SNARE proteinů zahrnuje tři podskupiny dále se lišící v charakteru N-koncové domény. Jsou to Qa, Qb a Qc SNAREs (Bock *et al.*, 2001). R-SNARE se dále dělí na dlouhé VAMPs (vesicle-associated membrane

proteins) (jinak také “longiny“) a krátké VAMPs (jinak také “breviny“) podle toho, zda obsahují krátkou variabilní doménu či dlouhou tzv. “longinovou“ doménu na N-konci (Filippini *et al.*, 2001). Fylogenetické analýzy sekvencí SNARE motivů ukazují, že jednotlivé proteiny podrodiny SNARE proteinů (Qa, Qb, Qc a R-SNAREs) různých eukaryot vykazují vysokou míru podobnosti a je tedy pravděpodobné, že k jejich rozdělení došlo velmi brzy v evoluci eukaryotické buňky (Kloepper *et al.*, 2007).

Vedle vysoce konzervované SNARE domény se mohou na N-konci proteinu vyskytovat další variabilní domény. Jejich přítomnost a charakter jsou rozhodující pro fyziologickou funkci SNARE proteinů (Dietrich *et al.*, 2003).

Pro membránovou fúzi zprostředkovanou SNARE proteiny je důležitá jejich interakce s membránou. Tato interakce může být zprostředkována jednou transmembránovou doménou (TMD) nebo kovalentní vazbou s membránovými lipidy přes specifické konzervované cysteiny (Filippini *et al.*, 2001). Případně může být role TMD nahrazena specifickými posttranslačními modifikacemi, jako je palmitoylace nebo farnesylace (McNew *et al.*, 1997). Tyto modifikace se však často vyskytují i u SNARE proteinů, které TMD mají. U těchto proteinů jsou pak modifikace zodpovědné například za ochranu před jejich degradací v proteasomu, jako je tomu v případě palmitoylace proteinu Tlg1 (Valdez-Taubas and Pelham, 2005).

Strukturální odlišnost jednotlivých SNARE proteinů a jejich vazebná specifita související s místem, kde je konkrétní SNARE protein lokalizován, určuje kompartmentalizaci uvnitř buněk (Sollner *et al.*, 1993). Zjednodušeně řečeno, podle přítomnosti různých SNARE na membránách buňka pozná, o jakou organelu se jedná. Tato tzv. SNARE hypotéza je dnes již všeobecně přijímaným faktem.

2.1.3 SNARE proteiny a membránová fúze

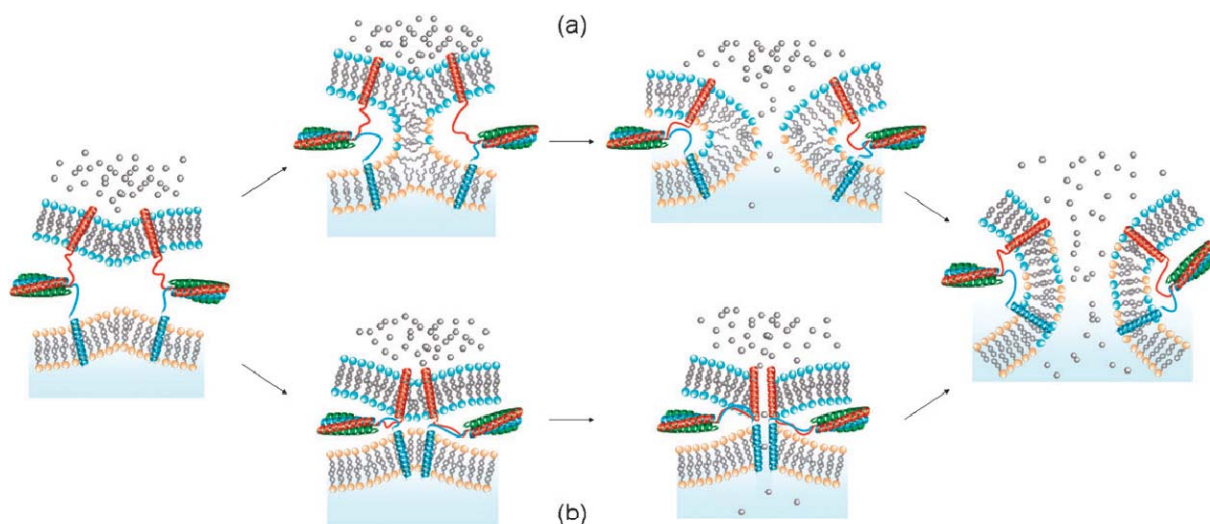
Vzhledem k intenzivnímu výzkumu, který provází SNARE proteiny v posledních letech, bylo zjištěno nepřehledné množství poznatků o procesu membránové fúze. Přesto existuje řada detailů týkajících se zejména molekulárních mechanismů samotné fúze, které je potřeba objasnit.

V klidové formě se SNARE proteiny v buňce vyskytují jako tzv. volné. Už v roce 1997 ale bylo zjištěno, že k fúzi dvou membrán je zapotřebí přítomnosti alespoň jednoho SNARE proteinu zakotveného v každé ze zúčastněných membrán (Nichols *et al.*, 1997). Dnes je však jisté, že plně funkční tzv. SNARE komplex musí obsahovat čtyři různé α -helixy.

Jednotlivé helixy představují SNARE motivy různých proteinů (Fasshauer *et al.*, 1997a; Fasshauer *et al.*, 1997b; Hazzard *et al.*, 1999; Margittai *et al.*, 2001). Takto vytvořený komplex je vysoce stabilní struktura, na jejíž rozpad je potřeba veliké množství energie. To je zařízeno ATPázou NSF (NEM - sensitive factor) a proteinem SNAP, který při reakci funguje jako kofaktor (Sollner *et al.*, 1993). První objevený SNARE komplex se skládal z jednoho R-SNARE a 3 Q-SNARE motivů z každé podrodiny poskytnutých proteiny syntaxinem-1A, synaptobrevinem-II a SNAPem-25B (Sutton *et al.*, 1998). Tento komplex se typicky vyskytuje při fúzi váčků uvnitř nervového spojení. Jako další příklad takového komplexu může sloužit struktura tvořená proteiny endobrevinem, syntaxinem 7, Vti1b a Syntaxinem 8 (Antonin *et al.*, 2002). V obou případech komplex obsahuje motivy z každé podrodiny SNARE proteinů, tedy R, Qa, Qb i Qc. Zastoupení každého typu SNARE motivu se zdá být uniformní, jelikož doposud nebyla pozorována jiná struktura komplexu *in vivo*. Nicméně *in vitro* pokusy ukazují, že je možné vytvořit SNARE komplexy, které *in vivo* vznikat nemohou (Fasshauer *et al.*, 1999; Yang *et al.*, 1999). V obou zmíněných studiích se pokoušeli nahradit jednotlivé členy SNARE komplexu jinými proteiny ze stejných podrodin. Téměř všechny z možných kombinací vytvořily více či méně stabilní komplexy, na jejichž rozpad bylo zapotřebí přítomnosti NSF a jeho kofaktoru SNAP. Tyto experimenty ukázali, že SNARE proteiny jsou schopny mezi sebou promiskuitně interagovat, pokud je dodrženo pravidlo zastoupení všech proteinových podrodin. Tato schopnost je pravděpodobně důsledkem jejich vysoké evoluční podobnosti.

Dnes existují dva modely znázorňující samotný proces. První model je odvozený od hypotézy vzniklé již v roce 1983 (Kozlov and Markin, 1983), podle které dojde k fúzi v okamžiku, kdy se k sobě dvě membrány přiblíží na určitou limitní vzdálenost. V této vzdálenosti na membrány mají působit takové síly, že dojde k jejich deformaci a vzájemnému částečnému propojení lipidových vrstev (tzv. hemifúzi), což poté vede k samotné fúzi. Tato teorie byla v průběhu času vyvracována faktem, že se k sobě membrány za fyziologických podmínek nemohou dostat dostatečně blízko. Spekulacím bylo učiněno zadost v roce 2006, kdy bylo publikováno, že SNARE proteiny jsou schopny k sobě přiblížit membrány až na vzdálenost 1 - 2nm (Chen *et al.*, 2006). Druhý model navrhuje možnost, že se při přiblížení membrán mezi nimi vytváří proteinový pór, kterým poté dojde ke smísení membránových obsahů a tedy k fúzi. Pór by v tomto případě měl být tvořen transmembránovými doménami jednotlivých SNARE proteinů. Práce podporující tuto teorii jsou shrnuty v publikaci (Jackson and Chapman, 2006). Oba modely jsou znázorněny na **obrázku 1**.

Další nedořešenou otázkou zůstává fakt, kolik SNARE komplexů je třeba, aby bylo dosaženo membránové fúze. Dlouhou dobu se minimální množství SNARE komplexů potřebných ke zprostředkování fúze pohybovalo v rozmezí 3-15 (Montecucco *et al.*, 2005). To se změnilo až v roce 2010, kdy byly provedeny *in vitro* experimenty s liposomy nesoucími na svém povrchu pouze jeden SNARE komplex. Ukázalo se, že i tyto liposomy jsou schopné fúze a tedy že pro úspěšnou membránovou fúzi stačí pouze jeden SNARE komplex vytvořený na rozhraní dvou membrán (van den Bogaart *et al.*, 2010).



Obrázek 1: Současné modely znázorňující proces membránové fúze. **A**, tzv. “proximity“ model je založen na možné deformaci membrán vzhledem k jejich vzájemné blízkosti; **B**, “protein-pore“ model, kdy se během fúze v membráně objevuje pór tvořený transmembránovými doménami SNARE proteinů. Převzato z (Marsden *et al.*, 2011).

2.2 Mitochondriální fúze

Proteiny, které se účastní mitochondriální fúze, jsou určeny výhradně pro procesy mitochondriální dynamiky. U kvasinek se na mitochondriální fúzi podílí dvě GTPázy Fzo1p (Mfn1/Mfn2) a Mgm1p (OPA1) a protein Ugo1p. (Proteiny v závorkách jsou homology nalezené v buňkách savců). Funkční komplex, který tyto proteiny dohromady vytvářejí, zajišťuje koordinované propojení fúze obou mitochondriálních membrán. Schéma takového proteinového komplexu je znázorněno na **obrázku 2**.

2.2.1. Fzo1p

GTPázy jsou klíčovými proteiny mitochondriální fúze, které byly nalezeny napříč různými skupinami eukaryot: Fzo (fuzzy onions) v kvasince (Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998) a octomilce (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 98kDa veliký protein, který se skládá ze tří sedmičlenných repetitivních, jedné N-koncové GTPázové domény a dvou C-koncových transmembránových segmentů (Hales and Fuller, 1997). Je to 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, kde zprostředkovává kontakt obou membrán (Hermann *et al.*, 1998; Fritz *et al.*, 2001). GTPázová doména je důležitá pro spojení vnějších membrán před jejich fúzí a navíc řídí rekrutování proteinu Mdm30, který je výrazným regulátorem celé fúze (Palmer *et al.*, 2011).

Savčí Mfn1 a Mfn2 jsou konzervované homology Fzo1 esenciální pro život buňky (Ishihara *et al.*, 2004). Oba homology obsahují N-koncovou GTPázovou doménu, dva úseky složené ze sedmičlenných repetitivních (HR1 a HR2) a dvě transmembránové domény blízko C-konce (Koshiba *et al.*, 2004). HR1 a HR2 oblasti se nacházejí každá na opačné straně transmembránových domén, které zakotvují protein do vnější mitochondriální membrány. Experimenty prováděné s Mfn1 ukázaly, že HR2 úseky dvou proteinů na různých membránách mitochondrií spolu interagují a fungují tedy i jako kotevní proteiny membrán určených k fúzi (Koshiba *et al.*, 2004). Recentní experimenty také ukázaly, že HR1 a HR2 oblasti jsou důležitými úseky proteinů, které vzájemnými interakcemi i interakcemi s ostatními proteiny významně ovlivňují proces mitochondriální fúze a tím i morfologii celé mitochondrie (Huang *et al.*, 2011). Poškození těchto proteinů vede k neurodegenerativnímu onemocnění syndromu Charcot-Marie-Tooth. Nedávná práce ukazuje, že Mfn2 se kromě mitochondrií nachází také na povrchu endoplasmatického retikula, kde zprostředkovává interakce 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).

2.2.2. 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 pombe* (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 studie z roku 2005 (Guillou et al., 2005) se zdá, že jde o protein mezimembránového prostoru zakotvený ve vnitřní mitochondriální membráně. Mgm1 je v buňce přítomen ve dvou formách, a to jednak v "dlouhé" formě (l-Mgm1p), která je membránově zakotvená, a jednak v "krátké" formě (s-Mgm1p), která je solubilní v mezimembránovém prostoru (Chan, 2006; Meeusen et al., 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., 2007). Různé procesování Mgm1p má na starost membránová proteáza v mezimembránovém prostoru Pcp1p (Sesaki et al., 2006), která protein štěpí v sekvencně specifickém místě zvaném RCR (rhomboid cleavage region) (Schäfer et al., 2010). 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). Obě formy proteinu jsou však ke správné mitochondriální fúzi nezbytné (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003; Herlan et al., 2004; Griparic et al., 2007; Song et al., 2007). Recentně bylo ukázáno, že krátká a dlouhá forma proteinu v buňce existují jako nefunkční monomery a že obě formy spolu interagují v *trans* homo- i heterotypické reakci, přičemž heterotypická reakce je nezbytná pro indukci mitochondriální fúze (DeVay et al., 2009; Zick et al., 2009). Také zde bylo ukázáno, že pouze s-Mgm1p má GTPázovou aktivitu. V neposlední řadě byl v těchto pracích navrhnout model fungování obou forem, podle kterého l-Mgm1p kotví s-Mgm1p do vnitřní mitochondriální membrány, kde poté oba proteiny zprostředkovávají samotnou fúzi.

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. Bylo publikováno, že za tento proces zodpovídá savčí homolog proteinu Pcp1p, tzv. PARL. Nicméně se zdá, že PARL neovlivňuje přímo samotnou mitochondriální fúzi, ale působí remodelaci mitochondriálních krist (Cipolat *et al.*, 2006). Kromě PARL existují další proteiny ovlivňující procesování OPA1. Jsou to například dvě protézy 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 (Griparic *et al.*, 2007; Song *et al.*, 2007).

2.2.2.1 Mgm1p a morfologie mitochondriálních krist

Mitochondriální kristy jsou výrazné struktury tvořené vnitřní mitochondriální membránou, které reprezentují 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).

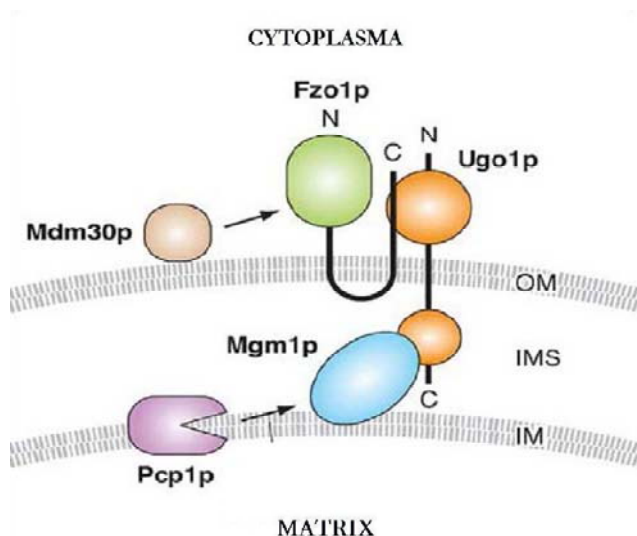
Ukazuje se, že na vzhled mitochondriálních krist má mimo jiné vliv i Mgm1. Tento protein byl pomocí elektronové mikroskopie v kristách lokalizován (Griparic *et al.*, 2004; Vogel *et al.*, 2006). Snížení exprese OPA1 (savčího homologu Mgm1p) způsobuje dezorganizaci mitochondriálních krist a rozšiřování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

2.2.3 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 má opačnou N/C koncovou topologii (Sesaki and Jensen, 2001). Bylo prokázáno, že N-konec proteinu je exponován do cytoplasmy a C-konec naopak do mezimembránového prostoru (Coonrod *et al.*, 2007). Protein dále obsahuje tři transmembránové úseky a v buňce se nachází

ve formě dimeru (Hoppins *et al.*, 2009). Je také nezbytný pouze pro samotnou fúzi membrán, nikoli však pro jejich setkávání (Hoppins *et al.*, 2009). U savců zatím funkční homolog Ugo1p nalezen nebyl a mechanismus propojení vnější a vnitřní mitochondriální membrány tak zůstává neznámý.

Samotný proces mitochondriální fúze prozatím zůstává neobjasněn. Jisté je, že nejprve dochází k homodimerizaci proteinu Fzo1 v závislosti na vazbě GTP a Ugo1. Tyto homodimery umožňují přiblížení mitochondriálních membrán, takzvaný “membrane tethering“. Následná hydrolyza GTP iniciuje fúzi vnějších membrán a Fzo1 je degradován pomocí proteinu Mdm30, čímž jeho úloha v mitochondriální fúzi končí (Anton *et al.*, 2011).



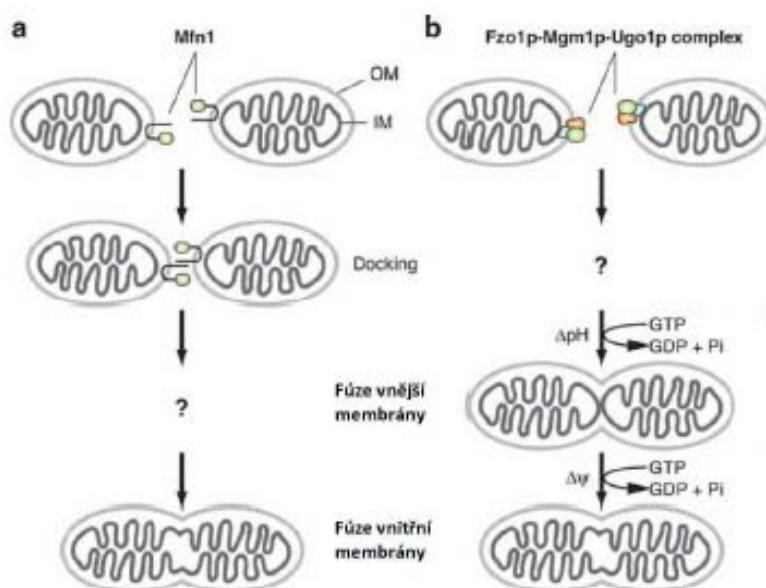
Obrázek 2: Lokalizace a topologie proteinů účastnících se mitochondriální fúze. Ugo1 protein interaguje s oběma GTPázami, Fzo1 i Mgm1, a zajišťuje tak propojení obou membrán. OM, vnější mitochondriální membrána; IM, vnitřní mitochondriální membrána; IMS, mezimembránový prostor (převzato z Okamoto and Shaw, 2005).

2.2.4 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 organelle (Koshiba *et al.*, 2004) (**obrázek 3a**). Toto spojení se nazývá *trans*-homotypická interakce. Předpokládá se, že tato interakce zvyšuje účinnost mitofusinu vázat, popř. hydrolyzovat GTP, což by mohlo mít za následek jejich konformační změnu a mitochondriální membrány by se tím 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.

Pro fúzi 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 alespoň jedna mitochondrie musí mít funkční proteiny na svém povrchu (Griffin and Chan, 2006). Pro aktivitu Fzo1 jsou navíc zapotřebí všechny tři sedmičlenné repetice. Repetice se účastní vzájemných *trans* interakcí i vazby na GTPázovou doménu a zprostředkovávají tak oligomerizaci 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 elektrochemického 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; $\Delta \psi$, potenciál vnitřní mitochondriální membrány; $\Delta p H$, protonový gradient vnitřní mitochondriální membrány (převzato z Okamoto a Shaw, 2005).

2.3 *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 orgány 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). V proteomu těchto redukováných mitochondrií bylo identifikováno pouze 20 proteinů (Jedelsky *et al.*, 2011). Proces dělení či fúze mitosomů nebyl u *G. intestinalis* zatím pozorován. Navíc je pravděpodobné, že jediný homolog dynaminu u *G. intestinalis* se na dělení mitosomů nepodílí (Gaechter *et al.*, 2008). V genomu tohoto prvoka také nebyl nalezen žádný homolog proteinové mašinerie zodpovědné za mitochondriální fúzi.

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 přítomnosti zodpovědných proteinů, 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.*, 2008a). Mezi těmito proteiny vyčnívá atypickou mitosomální lokalizací homolog proteinu Sec20. U *S. cerevisiae* je Sec20 typickým SNARE proteinem zajišťujícím transport váčků mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho systémem (Sweet and Pelham, 1992). Mitosomální lokalizace tohoto proteinu je unikátní mezi eukaryotickými organismy, jelikož jedinými doposud známými SNARE proteiny lokalizovanými v mitochondrii jsou (i) jedna sestříhová varianta proteinu VAMP-1 (Isenmann *et al.*, 1998) a (ii) protein SNAP23 (Jagerstrom *et al.*, 2009).

Sec20 *Giardia intestinalis* (*GiSec20*) byl identifikován jako člen Qb podrodiny SNARE proteinů. Jedná se o protein dlouhý 215 aminokyselin obsahující SNARE doménu v oblasti 122-174 a TMD v oblasti 184-204. Molekulová hmotnost proteinu je přibližně 24,5kDa. V “nulové vrstvě“ SNARE domény se u *GiSec20* nachází serin místo typického glutaminu. Mitosomální lokalizace proteinu byla zjištěna experimentálně episomální expresí (Elias *et al.*, 2008a). Při použití metody umlčování genů pomocí “antisense“ RNA bylo také zjištěno, že přítomnost *GiSec20* je esenciální pro přežívání trofozoitů (Elias *et al.*, 2008a).

Z hlediska topologie patří *GiSec20* mezi tzv. “tail-anchored“ proteiny, tedy proteiny zakotvené v membráně pomocí jedné transmembránové domény nacházející se na C-konci proteinu. Targetování tohoto typu proteinů je závislé na vlastnostech jejich konce, na kterém se TMD nachází a jejího bezprostředního okolí (Borgese *et al.*, 2007). Obecně platí, že čím kratší je transmembránová doména a čím více pozitivně nabitých aminokyselin je v jejím okolí, tím spíše bude protein targetován do mitochondrie. Za jiných podmínek bude protein spíše lokalizován v endomembránovém systému buňky (Borgese *et al.*, 2007).

Experimentálně bylo toto tvrzení podpořeno několika pracemi, například (Isenmann *et al.*, 1998; Kuroda *et al.*, 1998; Borgese *et al.*, 2001; Horie *et al.*, 2002; Motz *et al.*, 2002; Kaufmann *et al.*, 2003).

2.4 Kompartmentalizace mRNA

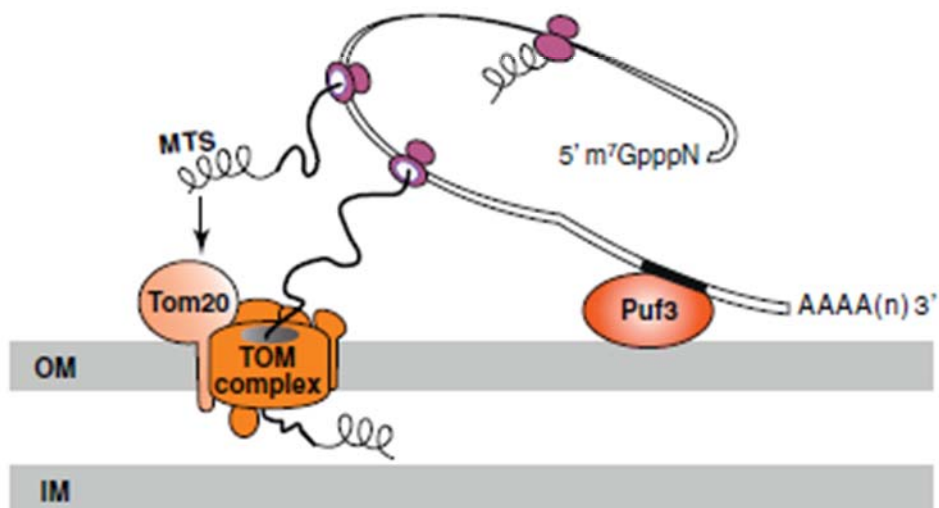
Fenomén kompartmentalizace mRNA byl objeven v posledních letech u kvasinky *S. cerevisiae* při zkoumání tzv. RNA vázajících proteinů (RBPs). Tyto proteiny zajišťují tak důležité procesy jako jsou například procesování RNA, její export z jádra, degradace či kontrola translačního procesu (Dreyfuss *et al.*, 2002; Maniatis and Reed, 2002; Mazumder *et al.*, 2003). Jedním z příkladů RBPs jsou tzv. PUF proteiny. Pro tyto proteiny je charakteristická přítomnost tzv. “Pumilio homology domain“ v několika repeticích. Právě tyto domény jsou zodpovědné za vazbu k RNA (Zamore *et al.*, 1997). PUF proteiny se váží na 3' nepřekládanou oblast (3'UTR) mRNA ve specifickém místě rozpoznávaném na základě nukleotidové sekvence (Wickens *et al.*, 2002; Gerber *et al.*, 2004).

U pěti PUF proteinů (Puf1p-Puf5p) *S. cerevisiae* byli identifikováni jejich vazební partneři metodou afinitní purifikace (Gerber *et al.*, 2004). Ukázalo se, že každý z těchto proteinů váže specifickou sadu mRNA kódujících různé typy proteinů. Spolu s Puf3p byly např. izolovány mRNA kódující téměř výhradně proteiny s mitochondriální lokalizací (Gerber *et al.*, 2004). Navíc byl u 79% z těchto mRNA objeven specifický sekvenční motiv ve 3'UTR (**obrázek 4**). Později bylo také zjištěno, že Puf3p je v buňce lokalizován do bezprostřední blízkosti mitochondrie a v případě delece *puf3* byla pozorována delokalizace některých mRNA, které se k Puf3p váží (Saint-Georges *et al.*, 2008). Model znázorňující roli Puf3p při targetování a translaci proteinů je zobrazen na **obrázku 5**.

Puf3p a lokalizace mRNA do blízkosti mitochondrie jsou však jen jedním z příkladů kompartmentalizace mRNA. Obecně PUF proteiny fungují při tomto procesu u mRNA kódujících nejrůznější typy proteinů. V těchto specifických místech poté může docházet např. k destabilizaci mRNA, inhibici či naopak aktivaci translace.



Obrázek 4: Specifický sekvenční motiv vyskytující se v 3'UTR mitochondriálních mRNA vázaných pomocí Puf3p. Převzato z (Gerber *et al.*, 2004).



Obrázek 5: Model lokalizace mitochondriálních mRNA pomocí Puf3p. Puf3p se váže na specifickou sekvenci mRNA v její 3'UTR, čímž jí stabilizuje v bezprostřední blízkosti mitochondrie. Během translace pak může být vznikající protein ihned transportován do mitochondrie pomocí specifických mitochondriálních přenašečů. OM, vnější mitochondriální membrána; IM, vnitřní mitochondriální membrána; TOM komplex a Tom 20, specifické mitochondriální přenašeče; MTS, mitochondriální targetovací sekvence zodpovědná za transport proteinu do mitochondrie; 5'm⁷GpppN a AAAA(n)3', modifikace mRNA. Převzato z (Quenault *et al.*, 2011).

3 Cíle práce

Hlavním cílem této práce bylo lépe charakterizovat homolog SNARE proteinu Sec20 u parazitického prvoka *Giardia intestinalis* a zjistit jeho případnou funkci v biogenezi mitosomů.

Praktické cíle:

1. Vytvořit specifickou polyklonální protilátku proti solubilní části *GiSec20*.
2. Ověřit mitosomální lokalizaci při episomální expresi *GiSec20* v *G.intestinalis* i za fyziologických podmínek.
3. Bioinformaticky i experimentálně charakterizovat targetovací signál *GiSec20*.
4. Pomocí specifické protilátky imunoprecipitovat vazebné partnery *GiSec20*.

4 Materiál a metody

4.1 Buněčné kultury

4.1.1 *Giardia intestinalis*

Pro veškeré pokusy byly použity trofozoiti *Giardia intestinalis* kmene WB (ATCC 30957). Buňky byly kultivovány v médiu TYI-S-33 (Keister, 1983) s 10% hovězím sérem (Gibco) při 37 °C. V případě transfekovaných linií byly buňky kultivovány v médiu s puromycinem (PAA laboratories) jako selekčním antibiotikem o koncentraci 54 µg/ml.

4.1.2 *Escherichia coli*

Pro namnožení rekombinantních plazmidů byly použity bakterie *Escherichia coli* kmene XL-1 blue. Transformace buněk byla prováděna tepelným šokem (42°C, 30s). Bakterie byly kultivovány při teplotě 37°C v LB médiu s přidaným ampicilinem o koncentraci 100µg/ml pro selekci pozitivních klonů.

Pro expresi proteinu za účelem výroby protilátky byly použity bakterie *E. coli* kmene BL21. Transformace i kultivace buněk byly prováděny obdobným způsobem jako u kmene XL-1 blue pouze s výjimkou použití kanamycinu pro selekci pozitivních klonů.

4.1.3 *Saccharomyces cerevisiae*

Pro pokusy s kvasinkami byly použity buňky *Saccharomyces cerevisiae* kmene YPH499. Buňky byly kultivovány na plotnách s YPD médiem při 30°C. V případě transfekovaných linií byly buňky kultivovány v minimálním (SD) médiu bez přidaného uracilu pro selekci pozitivních klonů.

Složení YPD média: 1l ddH₂O
10g Yeast extract (BD)
20g Trypticase peptone (BD)
20g D-glukóza (Lach-Ner)

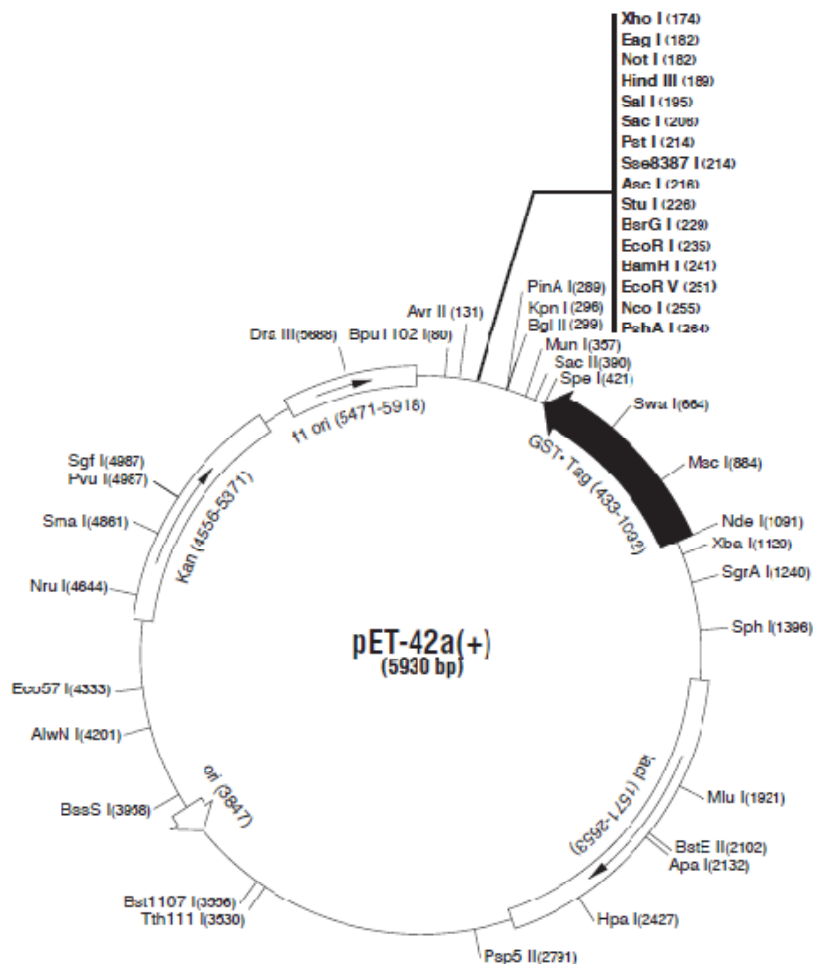
Složení SD média: 1l ddH₂O
20g D-glukóza (Lach-Ner)
6,7g Yeast nitrogen base (Sigma)
1,92g Drop out-URA (Sigma)

4.2 Plazmidy

Pro expresi proteinů v *Giardia intestinalis* byly použity plazmidy pOCT-PP2Aas (Lauwaet *et al.*, 2007). Pro expresi v bakteriích *E. Coli* plazmid pET-42b (Novagen) a pro klonování fragmentů DNA plazmid pGEM-T Easy (Promega). Expresi proteinů v kvasinkách *Saccharomyces cerevisiae* byla provedena v plazmidu pUG36 (Güldener and Hegemann - Heinrich-Heine-Universität, Germany).

4.2.1 Expresní plazmid pET-42b

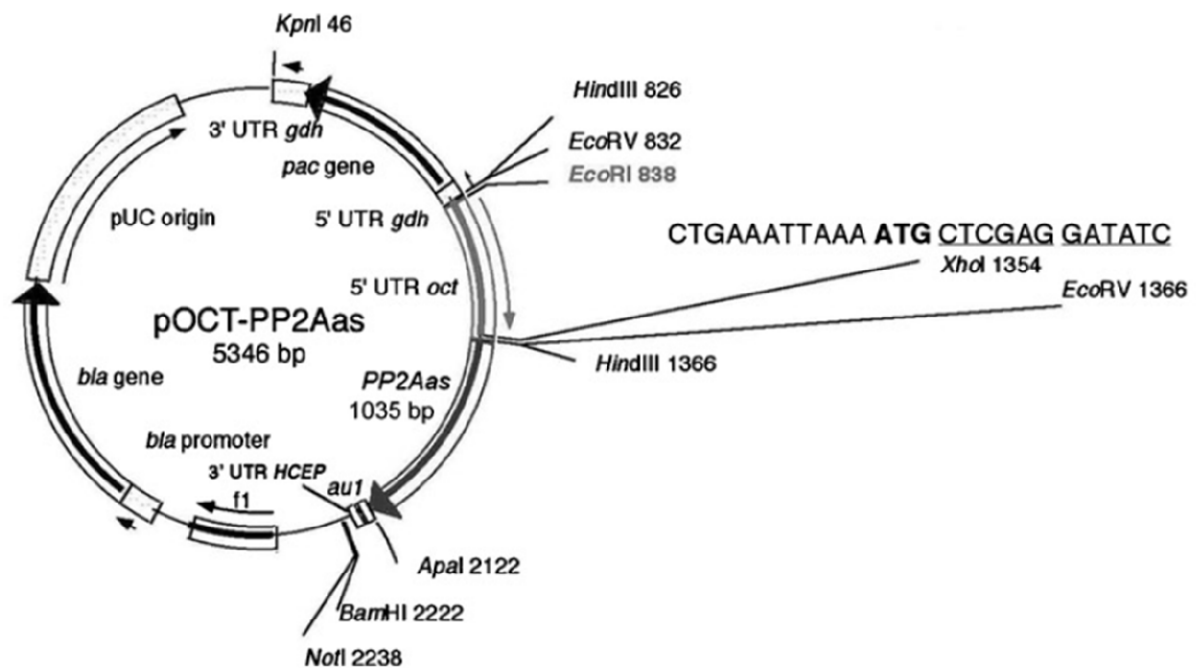
Jedná se o bakteriální typ plasmidu s IPTG indukovatelnou expesí obsahující gen pro resistenci ke kanamycinu. Expresi vloženého genu je řízena silným bakteriálním T7 promotorem. Jeho velikost je přibližně 5900bp. Plazmid obsahuje 2 His tagy a GST tag.



Obrázek 6: Mapa vektoru pET-42b s vyznačením restrikčních enzymů (převzato z <http://www.emdchemicals.com>).

4.2.3 pOCT-PP2Aas

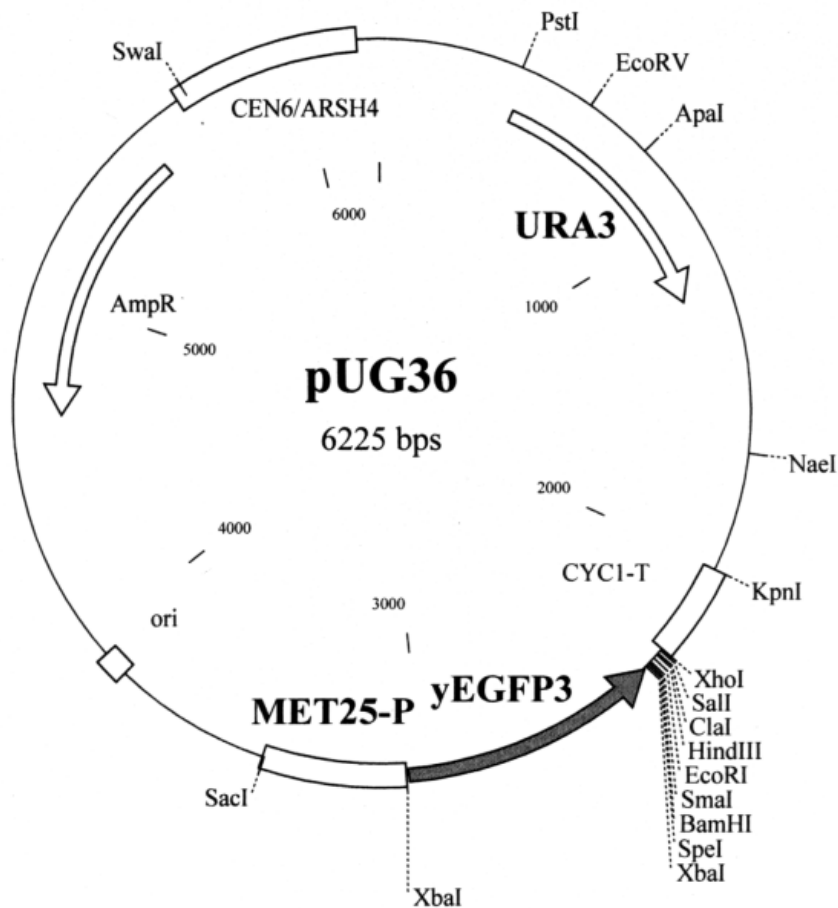
Do plazmidu pGEX-6P-1 (Amersham Pharmacia Biotech) byla vložena 5' nepřekládaná oblast (-502 až -1) genu pro *oct* (ornitin-karbamoyl transferáza), která slouží jako velice silný promotor v *G. intestinalis*. Za tuto oblast byla vložena *EcoRV* a *XhoI* restrikční místa (Lauwaet *et al.*, 2007). Takto modifikovaný plazmid je veliký 5346bp.



Obrázek 7: Mapa plazmidu pOCT-PP2Aas s vyznačením restrikčních enzymů. Převzato z (Lauwaet *et al.*, 2007).

4.2.4 Plazmid pUG36

Jedná se o plazmid odvozený od vektoru p416MET25 (Mumberg *et al.*, 1994). Protein vložený do tohoto vektoru je na N-konci značen yEGFP3 (Yeast-enhanced green fluorescent protein) (Cormack *et al.*, 1997). Takto modifikovaný GFP zajišťuje silnější fluorescenční signál a je rychleji excitován. Plazmid obsahuje gen pro uracil jako selekční marker. Je veliký 6225bp.



Obrázek 8: Mapa plazmidu pUG36 s vyznačením restričních enzymů (převzato z <http://mips.helmholtz-muenchen.de>).

4.3 Amplifikace genů

Jednotlivé geny a jejich části byly amplifikovány metodou polymerázové řetězové reakce (PCR). Pro amplifikaci genu *GiSec20* (přístupové číslo: XP_001706973) a jeho částí byla použita genomová DNA *G. intestinalis* izolovaná z buněk pomocí komerčního kitu “Hight Pure PCR Template Preparation Kit“ (Roche). Gen pro *gfp* byl amplifikován z vektoru SvH3P.pac (Dawson *et al.*, 2008).

Tabulky použitých primerů s vyznačenými sekvencemi pro restriční enzymy:

Primery pro expresi genů v *G. intestinalis*

Primery pro <i>GiSec20</i> s N-terminálně připojeným HA tagem a restričními místy <i>NdeI</i> a <i>ApaI</i>	
Forward	5' -CATGCATATGTACCCATACGATGTTCCAGATTACGCTATGAATGCTCAGCTG- 3'
Reverse	5' -CATGGGGCCCTTAAGGAAGAAACGG- 3'

Primery pro <i>GiSec20</i> bez HA tagu s restričními místy <i>NdeI</i> a <i>ApaI</i>	
Forward	5' -CATGCATATGAATGCTCAGCTGATT- 3'
Reverse	5' -CATGGGGCCCTTAAGGAAGAAACGG- 3'

Primery pro přirozenou 3'UTR <i>GiSec20</i> a restričními místy <i>ApaI</i> a <i>BamHI</i>	
Forward	5' -CATGGGGCCCTAAGTAGGCCCGCAGGAAGCG- 3'
Reverse	5' -CATGGGATCCGGCTCTTGCTCTAATCTGATT- 3'

Primery pro TMD (499-645bp) <i>GiSec20</i> s restričními místy <i>PstI</i> a <i>ApaI</i>	
Forward	5' -GTCACTGCAGGGCCGTCGGTGCATTTTCG- 3'
Reverse	5' -CATGGGGCCCTTAAGGAAGAAACGGGGG- 3'

Primery pro GFP s restričními místy <i>XhoI</i> a <i>PstI</i>	
Forward	5' -CATGCTCGAGATGGTGAGCAAGGGCGAG- 3'
Reverse	5' -CAGTCTGCAGCTTGTACCAGCTCGTCCAT- 3'

Primery pro dvojitý HA tag se specifickými přesahy *	
Forward	5' -TAGTATGTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCCA- 3'
Reverse	5' -TATGGGCATAGTCAGGCACGTCATAAGGATAGGCATAGTCAGGCACGTCATAAGGATACATAC- 3'

Primery pro expresi genů v *Saccharomyces cerevisiae*

Primery pro <i>GiSec20</i> s restrikčními místy <i>BamHI</i> a <i>XhoI</i>	
Forward	5' -CATGGGATCCATGAATGCTCAGCTGATT- 3'
Reverse	5' -CATGCTCGAGTTAAGGAAGAAACGGGGG- 3'

Primery pro expresi genů v *E.coli*

Primery pro část (1-540bp) <i>GiSec20</i> s restrikčními místy <i>NdeI</i> a <i>XhoI</i>	
Forward	5' -CATGCATATGAATGCTCAGCTGATT- 3'
Reverse	5' -CATGCTCGAGATCTCTTCGCTCGATTTT- 3'

* Tyto primery byly použity pro komplementární spárování nukleotidů za účelem přidání 2xHA tagu do vytvořeného konstruktů pOCT_HASec20. Dvojitý tag byl vložen mezi sekvenci promotoru a sekvenci *GiSec20* s N-koncovým HA tagem přes *NdeI* restrikční místo. Nukleotidy byly spárovány pomocí "Touchdown" programu, který umožňuje párování postupným snižováním teploty z 94°C na 52°C.

Znázornění jednotlivých kroků programu "Touchdown"

1	denaturace	94°C	5min
2 (42x)	párování nukleotidů	94 - 52°C **	30s
3		4°C	∞

** V každém cyklu se teplota sníží o 1°C

Převzato z diplomové práce Umlčování genů u *Giardia intestinalis*. Jan Pyrih, 2009

Znázornění výsledného DNA produktu:

```
5'- TAGTATGTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCTATCCTTATGACGTGCCTGACTATGCCCA-3'
  |||
3'- CACATAGGAATACTGCACGGACTGATACGGATAGGAATACTGCACGGACTGATACGGGTAT-5'
```

4.4 Izolace a klonování DNA fragmentů

1. Amplifikované PCR produkty byly analyzovány horizontální elektroforézou v 1 % agarózovém gelu. Nukleové kyseliny byly detekovány pomocí UV záření díky barvivu

SYBR[®] Safe (Invitrogen) obsaženém v gelu. Pro extrakci DNA z agarózového gelu byl použit “Qiaquick Gel Extraction kit“ (Qiagen).

2. V případě konstruktů pOCT_HA byl k namnožení DNA fragmentů použit kit “pGEM[®]- T-Easy Vectors System“ (Promega). Plazmidy byly poté z bakteriálních kultur izolovány komerčním kitem “High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche).

3. Zaligované fragmenty byly z plazmidu vyštěpeny dvojicí specifických restrikčních enzymů (Fermentas) podle doporučeného postupu a přečištěny přes agarózový gel. Ostatní konstrukty byly po extrakci ihned štěpeny specifickými restrikčními endonukleázami a přečištěny komerčním kitem “High Pure PCR Product Purification Kit“ (Roche).

4. Takto připravené fragmenty genů s kohezními konci byly vloženy ligační reakcí do příslušných expresních vektorů. Reakce s použitím T4 DNA ligázy (Fermentas) byla připravena podle doporučovaného postupu. Poté byla použita pro transformaci kompetentních bakterií XL1-blue tepelným šokem (42°C, 30s). Transformované bakterie byly vysety na agarové plotny s příslušným antibiotikem a kultivovány přes noc.

5. Z narostlých kolonií bylo vždy několik otestováno na přítomnost plazmidu s žádaným fragmentem. Test proběhl pomocí PCR z degradovaných bakterií za použití shodných podmínek jako při amplifikaci vloženého fragmentu. Přítomnost fragmentu byla zjišťována na agarózové elektroforéze. Pozitivní klony byly kultivovány a plazmidy izolovány komerčním kitem “High Pure Plasmid Isolation Kit“ (Roche).

6. Ověření korektního vložení fragmentů do plazmidů bylo provedeno kontrolní restrikcí specifickými endonukleázami (Fermentas) a přítomnost bodových mutací byla vyloučena sekvenací.

7. Ověřené klony bakterií byly napěstovány ve 100-150ml LB média s ampicilinem a plazmidy z nich vyizolovány kitem “Wizard[®] Plus Midipreps DNA Purification System“ (Promega).

8. Koncentrace plazmidu ve vzorcích byla stanovena na přístroji NanoDrop[™] 1000 Spectrophotometer.

4.5 Příprava rekombinantního proteinu pro výrobu protilátky

4.5.1 Exprese proteinu

Vzhledem k predikované topologii *GiSec20* (viz. Literární přehled, kapitola 2.3) byla pro tvorbu protilátky použita pouze predikovaná solubilní doména proteinu (1-180 AMK). Tato část byla zaklonována do inducibilního vektoru pET42b přes *NdeI* a *XhoI* restrikční místa a

exprimována v bakteriích *Escherichia coli* kmene BL21. Pozitivita jednotlivých klonů byla ověřena na SDS PAGE. Jeden z klonů byl poté kultivován v objemu 1,5l LB media s přidáním kanamycinem. Po nárustu kultury na OD 0,778 by zahájena exprese proteinu přidáním 0,5mM IPTG (isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid). Po 5 hodinách exprese byla buněčná kultura centrifugována při 6800xg, 10min, 4°C.

4.5.2 Izolace a purifikace proteinu

His-tagovaný protein byl izolován z bakterií afinitní purifikací pomocí Ni-NTA kolony (Qiagen) a poté přečištěn pomocí TALON[®] Metal Affinity Resin (Clontech) kolony. Obě procedury byly prováděny za denaturačních podmínek podle doporučeného protokolu. Protein z kolon byl eluován pomocí specifickým pufrů s hladinami pH 5,9 a 4,5. Přítomnost proteinu v jednotlivých izolovaných frakcích byla testována pomocí SDS-PAGE. Frakce s nejvyšším obsahem proteinu byly spojeny a takto izolovaný a přečištěný protein lyofilizován a zaslán do firmy Eurogentec jako antigen pro imunizaci dvou králíků.

4.6 Transfekce buněk *Giardia intestinalis*

1. Buňky odpoutat od stěn kultivační nádoby zchlazením na ledu po dobu 30 minut. Buněčnou kulturu poté centrifugovat při 1000xg, 10min, 4°C.
2. Pelet buněk resuspendovat ve sterilním TYI-S-33 médiu a znovu centrifugovat při 1000xg, 10min, 4°C.
3. Pelet buněk resuspendovat v 0,5ml sterilního TYI-S-33 média. Suspenzi 100x naředit v PBS pufru a mikroskopickým pozorováním v Bürkerově komůrce spočítat množství buněk. Součinem ředění a zjištěného počtu buněk vypočítat koncentraci buněk. Poté doředit suspenzi na koncentraci $3,3 \times 10^7$ buněk/ml.
4. Odebrat 300 μ l suspenze do 4mm elektroporační kyvety (4 milimetry široký sloupec elektroporované suspenze).
5. K suspenzi přidat 50 μ l plazmidu o koncentraci 1000 - 1500ng/ μ l a kyvety nechat 15min stát na ledu.
6. Elektroporovat
 1. "Exponenciální protokol": 350V, 1000 μ F, 750 Ω
 2. "Time constant protokol": 350V, 175ms
7. Kyvetu s buňkami inkubovat 15min na ledu, poté buňky přenést do 7ml zkušavky s médiem TYI-S-33 bez selekčních antibiotik.

- Po 24 hodinách do zkumavky přidat příslušné selekční antibiotikum (puromycin, G418). V případě přidaného puromycinu médium měnit po 72 hodinách za čerstvé. V případě geneticinu G418 měnit médium za čerstvé každých 24 hodin (první 4 dny přidávat antibiotikum v koncentraci 150 μ g/ml, pátý den v koncentraci 600 μ g/ml a poté měnit médium s vyšší koncentrací po 48 hodinách).
- Po tom, co buňky na stěnách zkumavky vytvoří souvislou vrstvu (cca 2 týdny), je možné je začít standardně očkovat.

4.7 Transfekce buněk *Saccharomyces cerevisiae*

- Buňky narostlé na plotně seškrábnout bakteriologickou kličkou a resuspendovat ve 20ml YPD média.
- Kulturu centrifugovat při 3000xg, 5 minut, 21°C.
- Buněčný pelet resuspendovat ve 25ml ddH₂O a centrifugovat při 1000xg, 5 minut, 21°C.
- Pelet resuspendovat v 900 μ l ddH₂O, převést do 1,5ml zkumavky a centrifugovat při 1000xg, 1 minutu, 21°C.
- Pelet resuspendovat v 0,1M LiAC (lithium acetát) do objemu 1ml a inkubovat 10 minut ve 30°C.
- Odebrat 100 μ l této suspenze do nové 1,5ml zkumavky a centrifugovat při 1000xg, 1 minutu, 21°C.
- K peletu postupně přidat (vrstvit) 300 μ l 40% PEG (polyetylen glykol), 42 μ l 1M LiAC, 10 μ l Salmon Sperm DNA (nosičová DNA), 100ng plasmidu a ddH₂O do celkového objemu 420 μ l.
- Směs vortexovat, dokud se vše nesmíchá a inkubovat 30 minut ve 30°C.
- Transformovat buňky tepelným šokem 42°C po dobu 30 minut.
- Směs centrifugovat při 1000xg, 1 minutu, 21°C.
- Pelet buněk resuspendovat ve 200 μ l ddH₂O, vysít na plotnu s SD -Ura médiem a kultivovat při 30°C.

4.8 Fluorescenční mikroskopie

Všechny preparáty byly pozorovány na mikroskopu Olympus IX81. Snímky byly pořízeny digitální kamerou Hamamatsu Orca-AG za použití programu Cell[^]R imaging.

4.8.1 Příprava preparátů trofozoitů *G. intestinalis*

1. Buňky *G. intestinalis* přenést na sklíčko do inkubační komůrky a nechat přisednout 30min při 37°C.
2. Fixovat 5 minut ve vychlazeném metanolu (-20°C).
3. Permeabilizovat inkubaci ve vychlazeném acetonu (-20°C) po dobu 5 minut.
4. Nechat zaschnout.

4.8.2 Fluorescenční značení trofozoitů *G. intestinalis*

Složení blokovacího roztoku: 0,25% BSA (sigma), 0,05% TWEEN[®] 20 (sigma), 0,25% želatina (Sigma)

Veškeré inkubace provádět ve vlhké komůrce.

1. Fixované a permeabilizované preparáty blokovat 1 hodinu v blokovacím roztoku.
2. Blokovací roztok slít a inkubovat preparáty 1 hodinu v blokovacím roztoku s přidanými primárními protilátkami.
3. Promýt 3 x 5 minut v PBS pufu.
4. Inkubovat v blokovacím roztoku s přidanými sekundárními protilátkami.
5. Promýt 3 x 5 minut v PBS pufu.
6. Montovat médiem VectaShield s DAPI (Vector laboratories) a pozorovat.

Pro značení jednotlivých proteinů byly použity následující protilátky: *GiSec20* byl značen specifickou králičí polyklonální protilátkou vytvořenou firmou Eurogentec naředěnou 1:1000. *GiTom40* byl značen králičí polyklonální protilátkou (Dagley *et al.*, 2009) naředěnou 1:1000. Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita anti-králičí protilátka konjugovaná s Alexa[®] fluor 594 (Invitrogen) ředěná 1:1000. Konstrukty obsahující HA tag byly značeny myší monoklonální anti-HA protilátkou ředěnou 1:100000. *GiPDI* byl značen polyklonální myší protilátkou (Adrian Hehl, University of Zurich) naředěnou 1:2000. GFP byl značen monoklonální anti-GFP protilátkou ředěnou 1:1000 (Santa Cruz). Jako sekundární protilátka byla ve všech třech případech použita anti-myší protilátka konjugovaná s Alexa[®] fluor 488 (Invitrogen) ředěná 1:1000. V případě experimentu s 3'UTR *GiSec20* (Výsledky, kapitola 5.3) byla proti HA-tagu použita krysí monoklonální anti-HA protilátka naředěná 1:100000. Jako sekundární protilátka byla v tomto případě použita anti-krysí protilátka konjugovaná s Alexa[®] fluor 594 (Invitrogen) ředěná 1:1000. DNA byla označena DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) obsaženým v montovacím médiu.

4.8.3 Fluorescenční značení cyst *G. intestinalis*

Cysty buněčných kultur *G. intestinalis* a protokol pro jejich fluorescenční barvení byly poskytnuty Mgr. Klárou Jirákovou (Oddělení Tropicke medicíny 1.LF UK).

1. Cysty (fixované na krycím skle) blokovat v 3% roztoku BSA (bovine serum albumin) (Sigma) v PBS po dobu 30min.
2. Inkubovat 1h s primárními protilátkami rozpuštěnými v 2% BSA, 0,1% Triton X-100 v PBS.
3. Promýt 3x10min v PBS.
4. Inkubovat 1h se sekundárními protilátkami rozpuštěnými v 2%BSA, 0,1% Triton X-100 v PBS
5. Promýt 3x10min v PBS
6. Montovat médiem VectaShield s DAPI a pozorovat.

Pro značení jednotlivých proteinů byly použity následující protilátky: *GiSec20* byl značen specifickou králičí polyklonální protilátkou vytvořenou firmou Eurogentec naředěnou 1:1000. *GiTom40* byl značen králičí polyklonální protilátkou naředěnou 1:1000. Jako sekundární protilátka byla v obou případech použita anti-králičí protilátka konjugovaná s Alexa[®] fluor 594 (Invitrogen) ředěná 1:1000. *GiPDI* byl značen polyklonální myší protilátkou naředěnou 1:2000. Jako sekundární protilátka byla použita anti-myší protilátka konjugovaná s Alexa[®] fluor 488 (Invitrogen) ředěná 1:1000. DNA byla označena DAPI (4',6-diamidino-2-fenylindol) obsaženým v montovacím médiu.

4.8.4 Příprava preparátů a značení buněk *S. cerevisiae*

Pro značení mitochondrií *S. cerevisiae* byl použit Mitotracker[®] Red TM (Invitrogen) ředěný 1:5000.

7. Buňky narostlé na plotnách seškrábnout bakteriologickou kličkou a rozpustit v 1ml YPD média s přidaným Mitotrackerem.
8. Inkubovat 30 minut při 30°C.
9. Centrifugovat při 1000xg, 1 minutu.
10. 1x promýt v 1ml ddH₂O a centrifugovat při 1000xg, 1 minutu.
11. Resuspendovat ve 200μl ddH₂O a 20μl z této směsi dát na podložní sklíčko.
12. Přidat 10μl 1% "Low-gelling" agarózy (Sigma), přikrýt krycím sklíčkem a pozorovat.

4.9 Hrubá frakcionace trofozoitů *G. intestinalis*

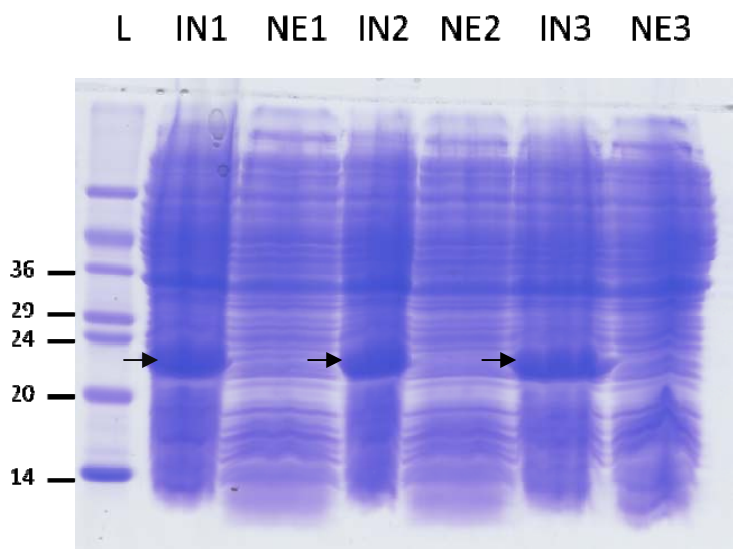
1. Narostlou buněčnou kulturu centrifugovat při 1000xg, 10 minut, 4°C.
2. Pelet buněk resuspendovat ve 20ml ST pufru. K suspenzi přidat inhibitory proteáz N-tosyl-L-lysin chlormetyl keton (TLCK) a leueptin (LEU) v koncentraci 1μl/1ml.
3. Buňky lyzovat sonikací s amplitudou 40 po dobu 1 minuty s délkou pulzu 1s. Sonikaci opakovat 3x. Odebrat část vzorku jako celkový buněčný lyzát.
4. Centrifugovat při 500xg, 10 minut, 4°C. Centrifugaci opakovat, dokud se tvoří pelet.
5. Supernatant centrifugovat při 45000RPM, 30 minut, 4°C - rotor Ti 50.2.
6. Supernatant uchovat (cytosolická frakce) a pelet resuspendovat v 1ml ST pufru s přidanými inhibitory TLCK a LEU ("Large granular fraction" - LGF).
7. Vzorky uchovávat při -80°C.

5 Výsledky

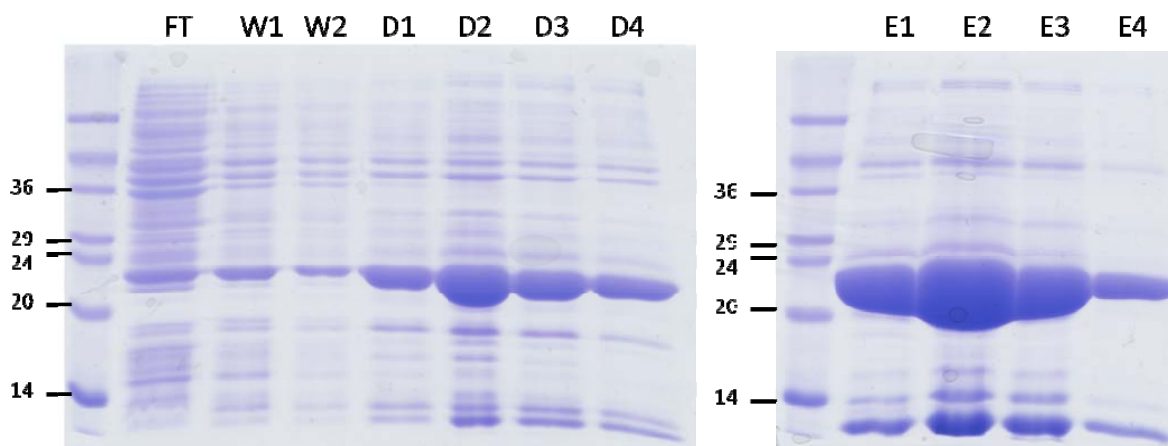
5.1 Lokalizace *GiSec20* v trofozoitech *G. intestinalis*

5.1.1 Exprese rekombinantního proteinu v *E. coli*

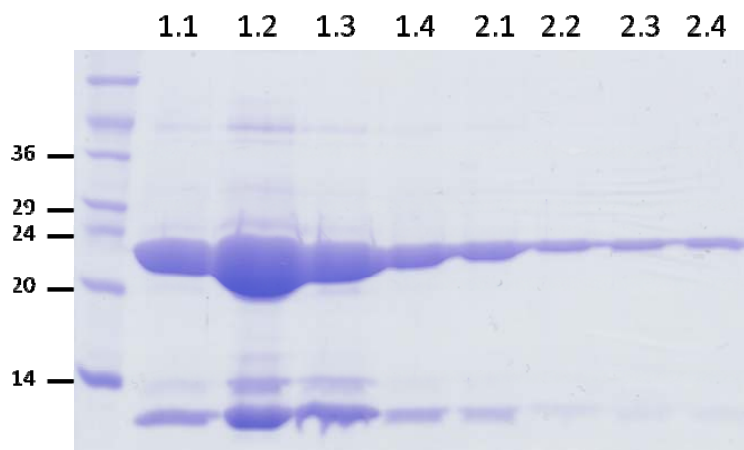
Za účelem tvorby protilátky proti *GiSec20* byla sekvence *sec20* genu odpovídající jeho solubilní části (1-543bp) (Elias *et al.*, 2008b) amplifikována metodou PCR z genomové DNA *G. intestinalis*. Namnožený DNA fragment byl vložen do expresního vektoru pET-42b přes *NdeI* a *XhoI* restrikční místa. Tímto konstruktem byly transformovány buňky *E. coli* kmene BL21. Po transformaci a indukci buněk byly 3 klony bakterií testovány pomocí SDS PAGE (**obrázek 9**). Z obrázku je patrné, že všechny tři klony po indukci IPTG exprimovaly protein požadované velikosti (znázorněno šipkou). Klon číslo jedna byl vybrán pro kultivaci v objemu 1,5l LB media. Z tohoto objemu bakteriální kultury byl poté na niklové matici vyizolován rekombinantní protein (**obrázek 10**). Nejvíce proteinu bylo ve frakcích D1-4 a E1-4. Tyto frakce byly poté spojeny a protein dále přečištěn na kobaltové matici (**obrázek 11**). Nejvíce proteinu bylo obsaženo ve frakcích 1.1 - 2.1. Tyto poté byly spojeny, protein lyofilizován a poslán do firmy Eurogentec, kde posloužil jako antigen pro imunizaci.



Obrázek 9: Analýza klonů *E. coli* pro ověření exprese proteinu pomocí SDS PAGE. IN1-3, indukované klony; NE1-3, neindukované klony.



Obrázek 10: Izolace proteinu na Ni-NTA koloně. SDS PAGE znázorňující čistotu jednotlivých frakcí a množství proteinu, které je v nich obsaženo. FT, flowthrough; W1-2, frakce po promytí wash pufrem; D1-4 a E1-4, frakce obsahující izolovaný protein.

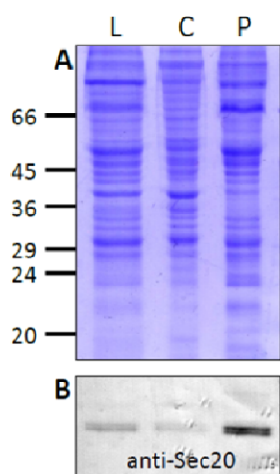


Obrázek 11: Purifikace proteinu pomocí TALON[®] Metal Affinity Resin kolony. SDS PAGE znázorňující čistotu jednotlivých frakcí a množství proteinu, které je v nich obsaženo. 1.1-2.4, frakce obsahující purifikovaný protein.

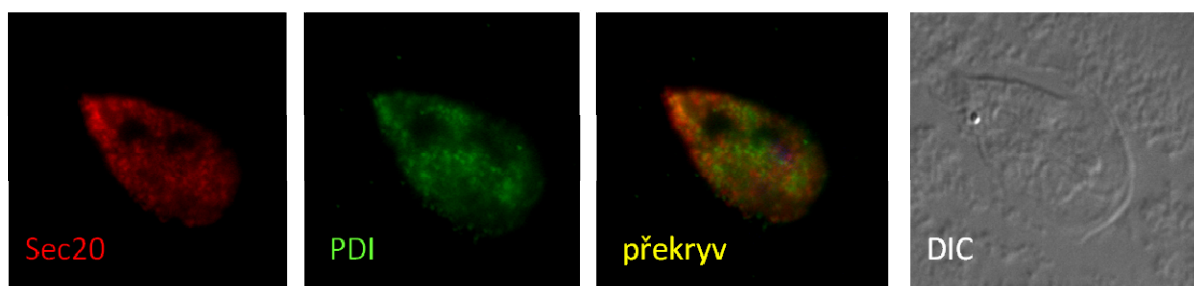
5.1.2 Testování protilátky

Získaná protilátka byla testována na buněčných frakcích a trofozoitech *G. intestinalis*. SDS PAGE ukazuje poměrné proteinové složení buněčných frakcí. Na western blotu je patrný silný signál v LGF, tedy buněčném peletu, který obsahuje mitosomy, endoplasmatické retikulum a ostatní membránové komponenty (**obrázek 12**). Pro zjištění lokalizace proteinu byla použita metoda nepřímé imunofluorescence (**obrázek 13**). Jako marker endoplazmatického retikula byla použita protilátka proti *GiPDI* (protein-disulfid-izomeráza). Na překryvu obrázků je patrná kolokalizace obou signálů, *GiSec20* se tedy zdá být lokalizován v endoplazmatickém

retikulu. Tato lokalizace proteinu je překvapivá, jelikož je v rozporu s publikovanou převážně mitosomální lokalizací proteinu (Elias *et al.*, 2008b) (viz. Literární přehled, kapitola 2.3).



Obrázek 12: Test protilátky proti *GiSec20* na buněčných frakcích *G. intestinalis*. **A**, proteinové složení buněčných frakcí zobrazené pomocí SDS PAGE. **B**, Test protilátky na jednotlivých frakcích pomocí western blotu; L, celkový buněčný lyzát; C, cytosolická frakce; P, LGF.

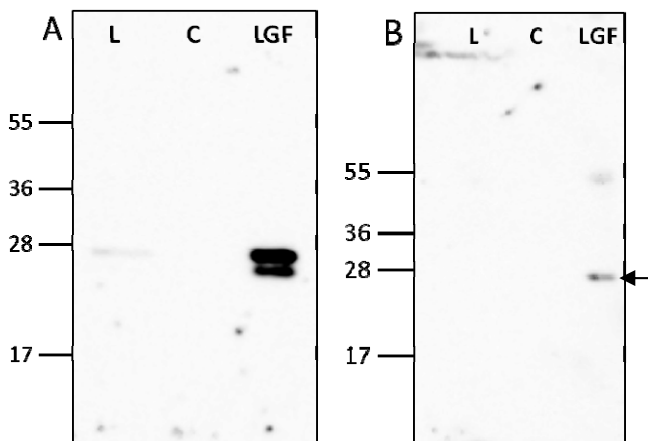


Obrázek 13: Test protilátky proti *GiSec20* na trofozoitech *G. intestinalis* pomocí nepřímé imunofluorescence. *GiSec20* je znázorněn červenou barvou, marker endoplazmatického retikula protein-disulfid-izomeráza (*GiPDI*) zelenou a překryv obou signálů žlutou barvou. Z překryvu signálů je patrné, že *GiSec20* je přítomen v endoplazmatickém retikulu. Poslední obrázek (DIC) ukazuje buňku pod diferenciálním kontrastem.

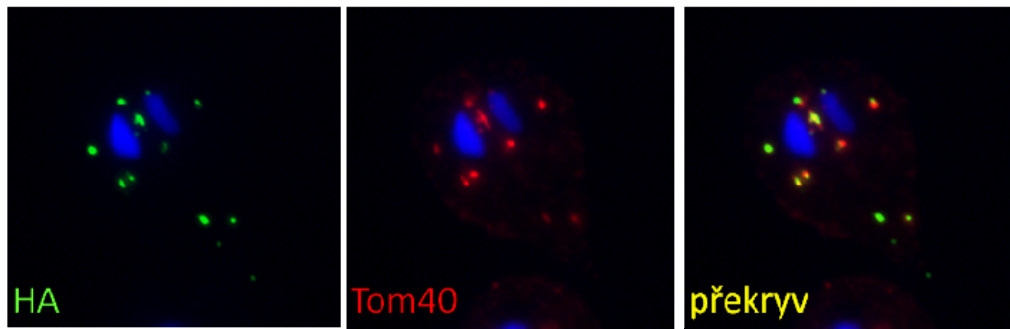
5.1.3 Overexprese *GiSec20*

Vzhledem k rozporu v lokalizaci proteinu (viz. Kapitola 5.1.2) byl vytvořen konstrukt obdobný tomu, jenž byl použit v publikaci (Elias *et al.*, 2008b). Metodou PCR byl naamplifikován gen pro *sec20* spojený s hemagglutininovým (HA) tagem na N-konci. Takto upravený fragment DNA byl vložen do vektoru pOCT-PP2Aas přes restrikční místa *NdeI* a *ApaI*. Plazmid byl poté vpraven do buněk *G. intestinalis*. Úspěšnost transfekce byla testována na western blotu (**obrázek 14**) dvěma protilátkami, anti-*GiSec20* (**obrázek 14 A**) a anti-HA (**obrázek 14 B**). Dvojitý signál ve frakci LGF na obrázku A je způsoben jadernou, respektive

episomální expresí genu. Horní band má větší molekulovou hmotnost díky přítomnosti HA tagu. Na celkovém buněčném lyzátu je patrný pouze horní band. Spodní signál není zřetelný pravděpodobně kvůli malému množství proteinů přítomných ve vzorku. Na obrázku B je zřetelný pouze signál horního bandu ve frakci LGF (šipka). Ani v jednom případě není patrný signál v cytoplazmě, což odpovídá predikované topologii proteinu, konkrétně jeho zakotvení v membráně. Je zřejmé, že transfekce buněk *G. intestinalis* vektorem pOCT-PP2Aas s vloženým genem pro *GiSec20* byla úspěšná. Lokalizace proteinu byla ověřena metodou imunofluorescence (**obrázek 15**). Protein značený HA tagem byl lokalizován monoklonální anti-HA protilátkou. Jako mitosomální marker byla použita protilátka proti proteinu vnější mitosomální membrány *GiTom40* (Dagley *et al.*, 2009). Z překryvu signálů je patrné, že overexprimovaný protein je v buňce targetován do mitosomů.

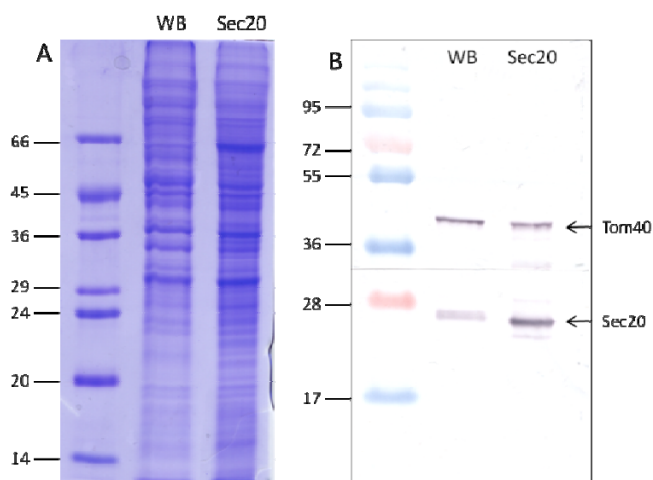


Obrázek 14: Distribuce *GiSec20* s připojeným HA tagem po transfekci buněk *G. intestinalis* vektorem pOCT-PP2Aas znázorněná na western blotu. Testovány byly buněčné frakce transformovaného kmene (i) celkový lyzát (L), (ii) cytosol (C) a (iii) LGF. **A**, anti-*GiSec20* protilátka značí dva různě kódované proteiny ve frakci LGF lišící se přítomností HA tagu, tedy velikostí. V celkovém buněčném lyzátu je patrný pouze signál většího, HA tag obsahujícího, proteinu; **B**, anti-HA protilátka značí větší protein s připojeným HA tagem a to pouze na buněčné frakci LGF. Transfekce buněk *G. intestinalis* tedy proběhla úspěšně.

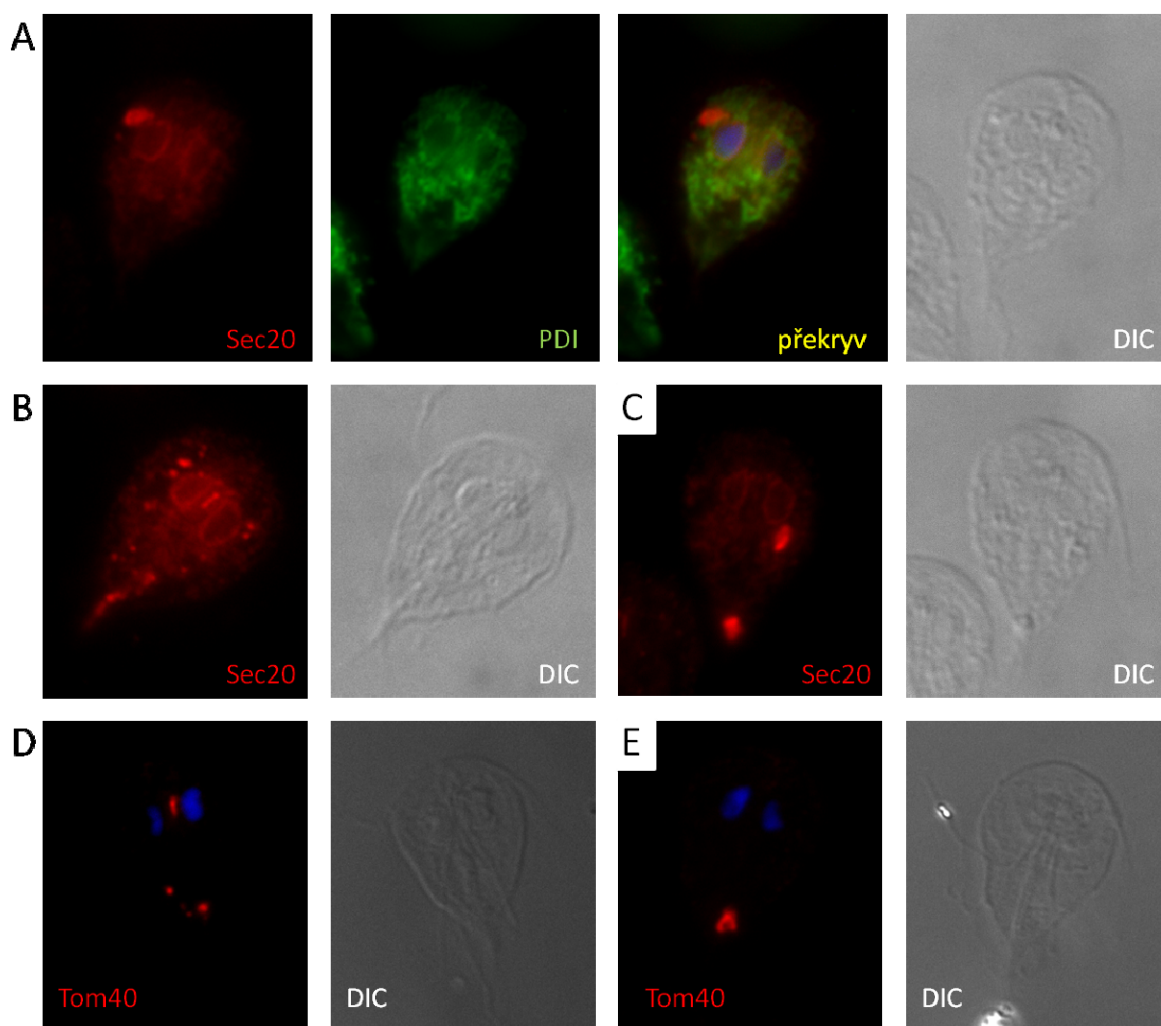


Obrázek 15: Lokalizace HA-tagovaného *GiSec20* pomocí nepřímé imunofluorescence. Zelený signál anti-HA protilátky kolokalizuje s mitosomy značenými anti-*GiTom40* protilátkou (červená barva). Buněčná jádra (modře) jsou značena DAPI. Overexprimovaný *GiSec20* je targetován výhradně do mitosomů.

K ověření toho, zda mitosomální lokalizace *GiSec20* není pouhým artefaktem způsobeným přítomností HA tagu na N-konci proteinu, byl stejným způsobem vytvořen konstrukt, který se od výše zmíněného liší pouze absencí HA tagu. Úspěšnost transfekce buněk *G. intestinalis* tímto plazmidem byla testovaná na western blotu (**obrázek 16**). Pro určení poměrné hladiny exprese *GiSec20* v divokém kmeni *G. intestinalis* a námi vytvořeném kmeni overexprimujícím *GiSec20* (*Gi_Sec20*) vůči ostatním proteinům byl použit mitosomální marker *GiTom40*. Na rozdíl od hladiny exprese *GiSec20* se hladina exprese *GiTom40* nezvýšila. Lokalizace proteinu byla ověřena pomocí nepřímé imunofluorescence (**obrázek 17**). Pro lokalizaci proteinu v tomto případě nemohla být použita anti-HA monoklonální protilátka, protein byl tedy lokalizován anti-*GiSec20* protilátkou, která ukázala, že je částečně lokalizován do endoplazmatického retikula (anti-*GiPDI* protilátka jako marker endoplazmatického retikula) a částečně do mitosomů. Mitosomální lokalizace overexprimovaného proteinu tedy není artefaktem přítomnosti HA tagu na jeho N-konci.



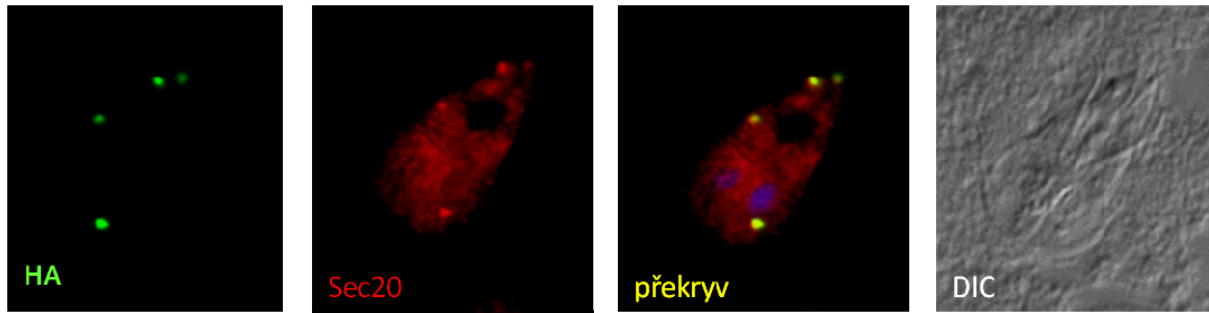
Obrázek 16: Distribuce *GiSec20* bez připojeného HA tagu v divokém kmeni *G. intestinalis* (WB) a kmeni *Gi_Sec20* (Sec20). **A**, SDS PAGE ukazující poměrné hladiny proteinů v divokém kmeni *G. intestinalis* a kmeni *Gi_Sec20*; **B**, western blot buněčných lyzátů divokého kmene *G. intestinalis* a kmene *Gi_Sec20* znázorňující poměr hladiny expresí *GiSec20* a *GiTom40* v obou kmenech. Pro detekci hladin proteinů byly použity specifické polyklonální protilátky. Z poměrů hladin exprese je patrné, že transfekce buněk proběhla úspěšně. Hladina exprese *GiSec20* je vyšší v kmeni *Gi_Sec20* než v divokém kmeni, zatímco hladina exprese *GiTom40* zůstává nezměněna.



Obrázek 17: Lokalizace *GiSec20* v buňkách *Gi_Sec20* pomocí nepřímé imunofluorescence. **A**, červený signál *GiSec20* částečně kolokalizuje se zeleným signálem *GiPDI* (marker endoplazmatického retikula). Z obrázků je patrná distribuce obou signálů v endoplazmatickém retikulu. Modrý signál na překryvu značí DNA obarvenou DAPI. Silnější červený signál nad levým buněčným jádrem je podobný výrazným signálům na obrázcích **B** a **C**, na kterých je červeně znázorněna lokalizace *GiSec20*. Červený signál na obrázcích **D** a **E** ukazuje mitosomy značené anti-*GiTom40* protilátkou. Z porovnání všech obrázků je patrné, že výrazné červené signály z obrázků **A**, **B** a **C** odpovídají signálům *GiTom40* na obrázcích **D** a **E**. Je tedy zřejmé, že *GiSec20* je v buňkách lokalizován jak v mitosomech tak i v endoplazmatickém retikulu. Zkoumané proteiny byly značeny specifickými protilátkami. DIC znázorňuje buňky pod diferenciálním kontrastem. Obě použité protilátky jsou králičí séra, a proto nemohly být použity pro dvojité značení.

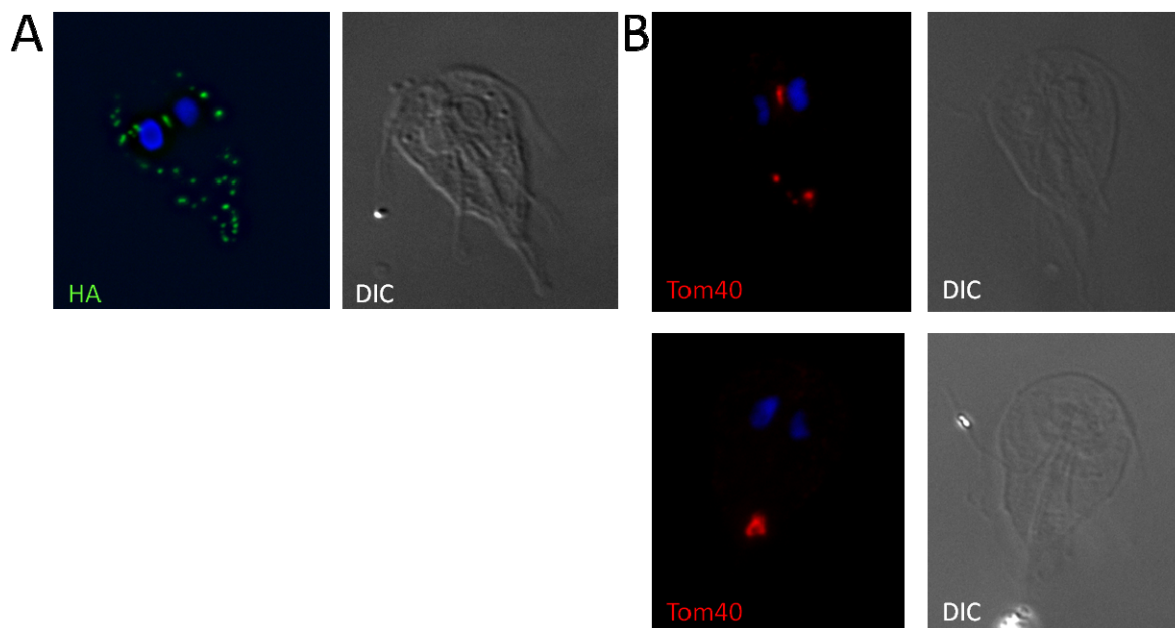
Po značení kmene *G. intestinalis* overexprimujících *GiSec20* s HA tagem (*Gi_Sec20_HA*) anti-HA a anti-*GiSec20* protilátkami jsme pozorovali překvapivý výsledek (**obrázek 18**). Část *GiSec20* značená anti-HA protilátkou je targetována výhradně do mitosomů, zatímco anti-*GiSec20* protilátka značí protein jak v mitosomech tak v endoplazmatickém retikulu. Kolokalizace signálů ukazuje, že část proteinu v buňce vzniklá episomální expresí z plazmidu

je targetována výhradně do mitosomů, zatímco jaderně kódovaný protein je lokalizován v endoplazmatickém retikulu. Tudiž se jeví, že v přirozeném stavu je *GiSec20* v buňce *G. intestinalis* lokalizován v endoplazmatickém retikulu a do mitosomů se dostává pouze pokud je overexprimován.



Obrázek 18: Lokalizace *GiSec20* v buňkách *Gi_Sec20_HA* pomocí nepřímé imunofluorescence. Anti-HA protilátka (zelený signál) značí *GiSec20* s HA tagem, který byl vložen do plazmidu pOCT-PP2Aas. Anti-*GiSec20* protilátka (červený signál) značí veškerý *GiSec20* v buňce. Na překryvu je patrná kolokalizace obou signálů. Ta ukazuje dva rozdílné populace proteinu v buňce v závislosti na způsobu jeho exprese. DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.

Když srovnáme přirozenou distribuci mitosomů v buňce *G. intestinalis* a jejich rozložení v námi vytvořeném kmeni *Gi_Sec20*, je zde patrná markantní změna (**obrázek 19**). Zatímco v divokém kmeni *G. intestinalis* jsou mitosomů desítky, v kmeni *Gi_Sec20* došlo k redukci počtu mitosomů, jejich redistribuci a zdánlivému zvětšení.



Obrázek 19: Srovnání normální distribuce mitosomů s jejich rozložením v kmeni *Gi_Sec20* metodou nepřímé imunofluorescence. **A**, HA tagem značené mitosomy v trofozoitech *G. intestinalis* (zelený signál) a modře značená DNA (DAPI). **B**, Redukce počtu mitosomů, jejich redistribuce a případná fúze v kmeni *Gi_Sec20*. Mitosomy jsou zde značeny anti-*GiTom40* protilátkou (červený signál). Modrý signál značí DNA (DAPI). DIC znázorňuje buňky pod diferenciálním kontrastem.

5.2 Targetovací informace proteinu *GiSec20*

5.2.1 Bioinformatická analýza *GiSec20*

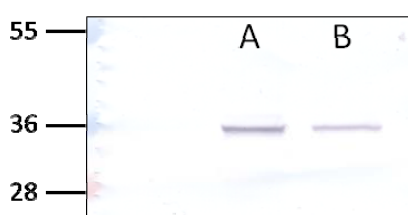
Vzhledem k výše uvedeným nesrovnalostem v lokalizaci *GiSec20* jsme se pokusili zjistit, v jaké části proteinu leží informace rozhodující o jeho lokalizaci. Jak bylo zmíněno v literárním přehledu (kapitola 2.3), jedná se o tzv. “tail-anchored“ protein, jehož targetování by mělo být řízeno vlastnostmi TMD a jejího okolí (Borgese *et al.*, 2007). Na základě výše zmíněných parametrů byla prozkoumána TMD *GiSec20* a její okolí. Ta se ukázala být dlouhá 18AMK a od její poslední aminokyseliny směrem k C-konci proteinu byly objeveny 3 pozitivně nabitě aminokyseliny (Arg-204, Arg-205, His-207). Po provedení výpočtu podle publikace (Borgese *et al.*, 2007) vyšel náboj na C-konci *GiSec20* +2, což je jednoznačný signál pro targetování proteinu do vnější mitochondriální membrány.

5.2.2 Ověření targetovací funkce transmembránové domény *GiSec20*

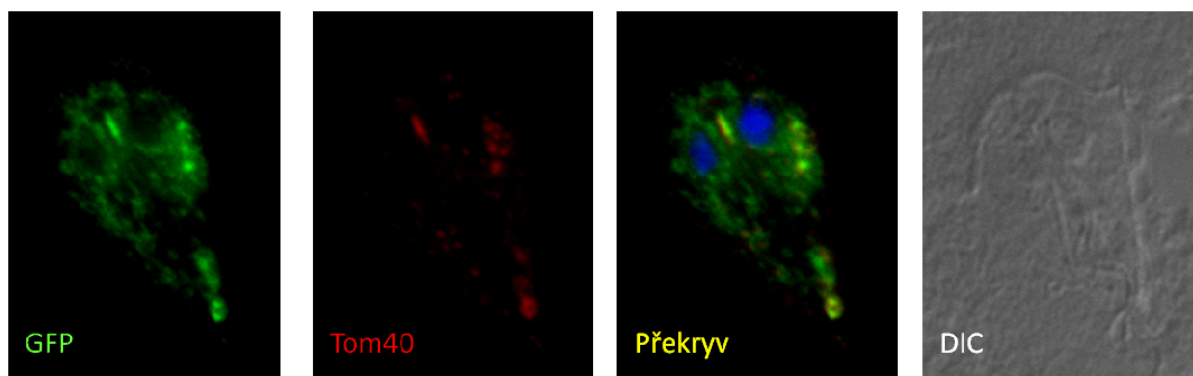
Pro experimentální ověření targetovací funkce transmembránové domény *GiSec20* jsme kromě *Giardia intestinalis* využili i modelový systém kvasinky *Saccharomyces cerevisiae*.

5.2.2.1 Targetovací funkce TMD *GiSec20* v *G. intestinalis*

Targetovací funkce TMD byla zjišťována episomální expresí C-koncové části *GiSec20* s GFP tagem. Nejprve byl metodou PCR namnožen úsek kódující C-koncovou část *GiSec20* (499-645bp) z genomové DNA *G. intestinalis* a gen pro GFP z vektoru SvH3P.pac (Dawson *et al.*, 2008). DNA fragment C-konce *GiSec20* byl zaklonován do vektoru pOCT-PP2Aas přes *PstI* a *ApaI* restrikční místa. K N-konci tohoto fragmentu byl poté připojen *gfp* přes *XhoI* a *PstI* restrikční místa. Tímto konstruktem byly transfekovány buňky *G. intestinalis*. Úspěšnost transfekce byla testována na liniích *G. intestinalis* metodou western blotu (**obrázek 20**). Obě testované linie exprimovaly GFP, transfekce tedy byla úspěšná. Pro další pokusy byl vybrán klon A (*Gi_GFP_A*). U tohoto klonu byla testována lokalizace GFP metodou nepřímé imunofluorescence (**obrázek 21**). Jako mitosomální marker byla použita protilátka proti *GiTom40*. Z překryvu obou signálů je zřejmé, že targetovací signál obsažený v transmembránové doméně *GiSec20* je dostatečný pro lokalizaci proteinu do mitosomů *G. intestinalis*. Zároveň lze soudit, že ne všichni GFP je lokalizován v mitosomech. Část proteinu se zdá být přítomna také v endoplazmatickém retikulu.



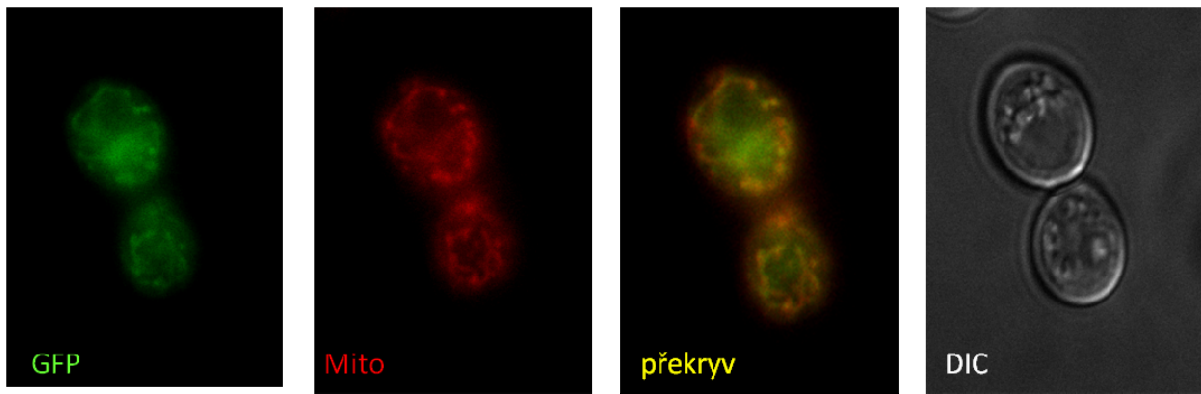
Obrázek 20: Expresa chimerického proteinu GFP-TMD(*GiSec20*) po transfekci buněk *G. intestinalis* vektorem pOCT-PP2Aas obsahujícím GFP tag a TMD *GiSec20* znázorněná na western blotu. Buněčné lyzáty dvou linií (A, B) byly testovány na přítomnost exprese GFP. U obou klonů je exprese patrná. Protein byl detekován pomocí anti-GFP protilátky. Transfekce byla úspěšná v obou případech.



Obrázek 21: Lokalizace GFP v buňkách *Gi_GFP_A* pomocí nepřímé imunofluorescence. Lokalizace GFP je znázorněna zelenou barvou, lokalizace mitosomálního proteinu *GiTom40* červenou barvou. Na překryvu obrázků je patrná kolokalizace obou signálů. Modře je značená DNA (DAPI). GFP s C-koncovou oblastí *GiSec20* je v buňce *G. intestinalis* lokalizován částečně v mitosomech, částečně se však zdá být v endoplazmatickém retikulu. Zkoumané proteiny jsou značeny specifickými protilátkami. DIC znázorňuje buňku pod diferenciálním kontrastem.

5.2.2.2 Targetovací funkce TMD *GiSec20* v *S. cerevisiae*

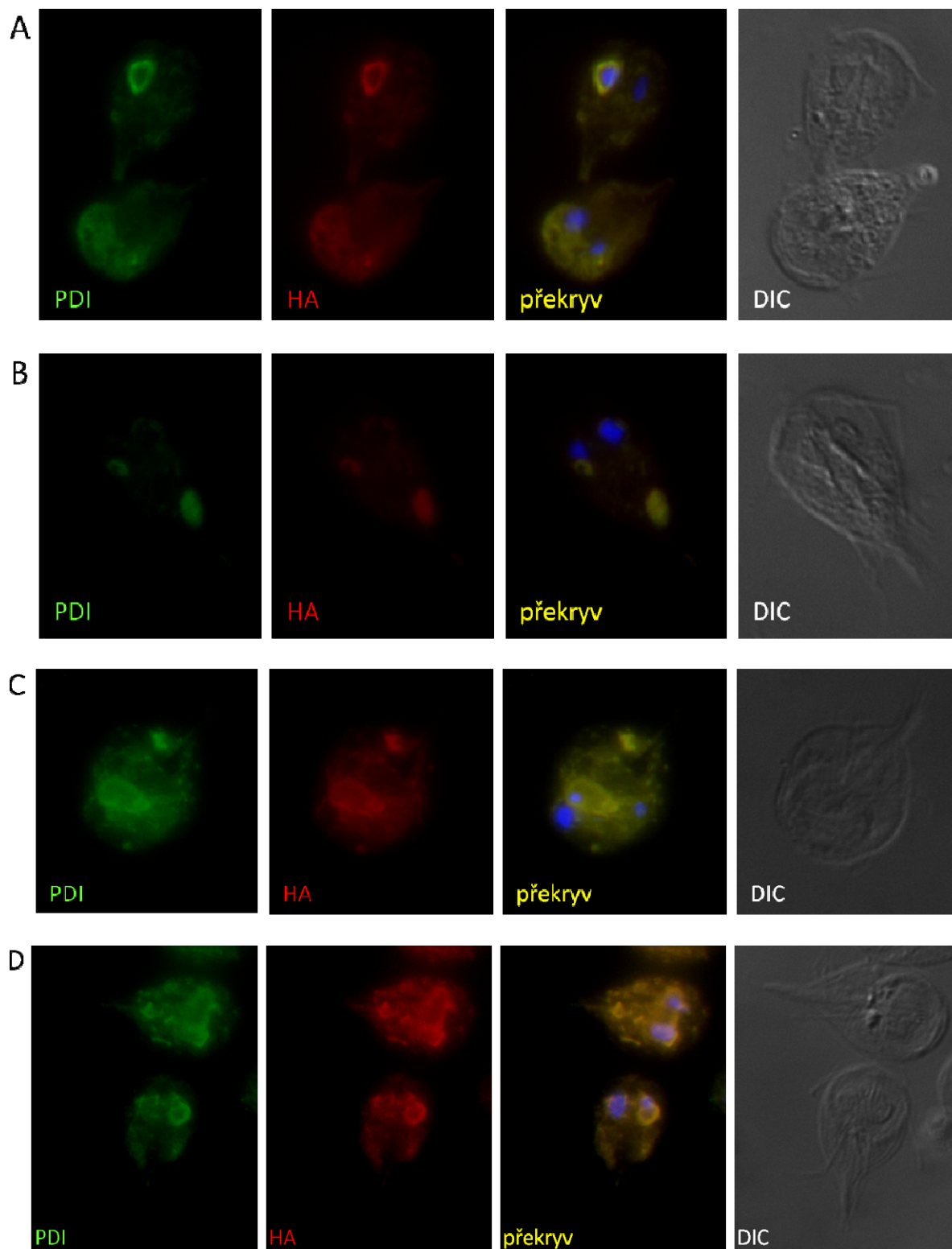
Ke zjištění, zda je informace obsažená v C-koncové oblasti proteinu *GiSec20* dostatečná pro targetování proteinů do mitochondrie kvasinky *S. cerevisiae*, byl vytvořen následující konstrukt. Metodou PCR byla naamplifikován gen *sec20* z genomové DNA *G. intestinalis*. Tento fragment byl poté vložen do expresního vektoru pUG36 přes *BamHI* a *XhoI* restrikční místa. V tomto vektoru je v blízkosti N-konce vloženého proteinu přítomen GFP tag, pomocí kterého je možné detekovat expresi kýženého proteinu. Konstrukt byl poté vpraven do buněk *S. cerevisiae*. Expres proteinu byla v živých buňkách (*Sc_GFP*) detekována fluorescencí (**obrázek 22**). Jako mitochondriální marker byl použit Mitotracker[®] Red TM. Z překryvu signálů je patrné, že targetovací signál uložený v C-koncové části proteinu *GiSec20* je dostačující k transportu proteinu do mitochondrie *S. cerevisiae*.



Obrázek 22: Lokalizace GFP v kvasince *S. cerevisiae* kmene *Sc_GFP* pomocí fluorescence (zelený signál). Mitochondrie je značena komerčně dostupnou barvičkou Mitotracker[®] Red TM. Na překryvu je patrná kolokalizace obou signálů. TMD *GiSec20* je tedy schopna lokalizovat protein do mitochondrie *S. cerevisiae*.

5.3 Overexprese *GiSec20* s přirozenou 3'UTR

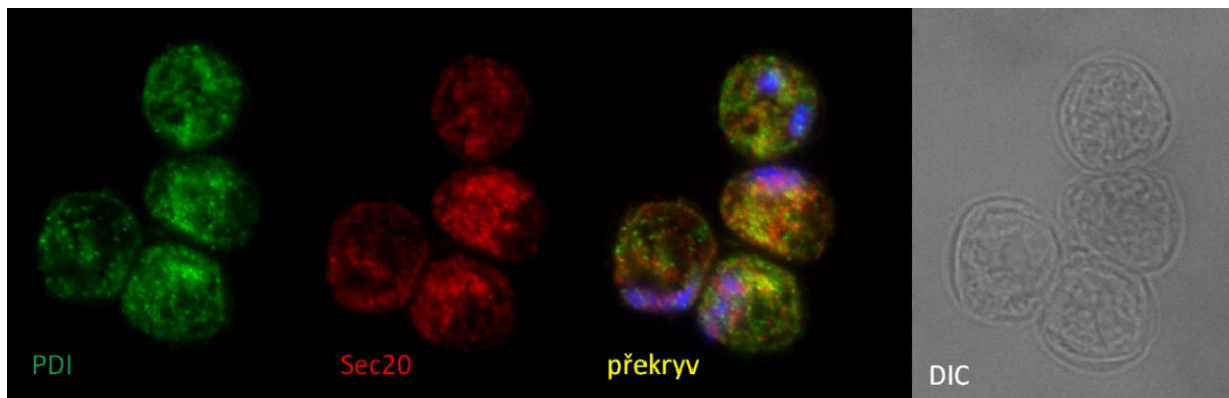
Pro ověření hypotézy, zda je *GiSec20* v *Giardia intestinalis* targetován přednostně na úrovni mRNA, jako je tomu v případě některých mitochondriálních mRNA u kvasinky *Saccharomyces cerevisiae* (viz. Literární přehled, kapitola 2.4), byl vytvořen následující konstrukt. Gen *sec20* byl amplifikován spolu s HA tagem a svou přirozenou 3'UTR z genomové DNA *G. intestinalis*. Takto amplifikovaný gen byl vložen do vektoru pOCT-PP2Aas přes *NdeI* a *ApaI* restrikční místa. Tímto konstruktem byly transfekovány trofozoiti *G. intestinalis* a lokalizace proteinu v takto vytvořeném kmeni (*Gi_Sec20_HA_3'UTR*) byla testována metodou nepřímé imunofluorescence (**obrázek 23**). Ukázalo se, že overexprimovaný protein značený anti-HA protilátkou je lokalizován výhradně do endoplazmatického retikula (jako ER marker byla použita anti-*GiPDI* protilátka). Stejně jako v případě mitosomální lokalizace proteinu (kapitola 5.1.3) došlo i zde k masivní organelární fúzi, která vedla k dramatickému snížení růstu trofozoitů *G. intestinalis*.



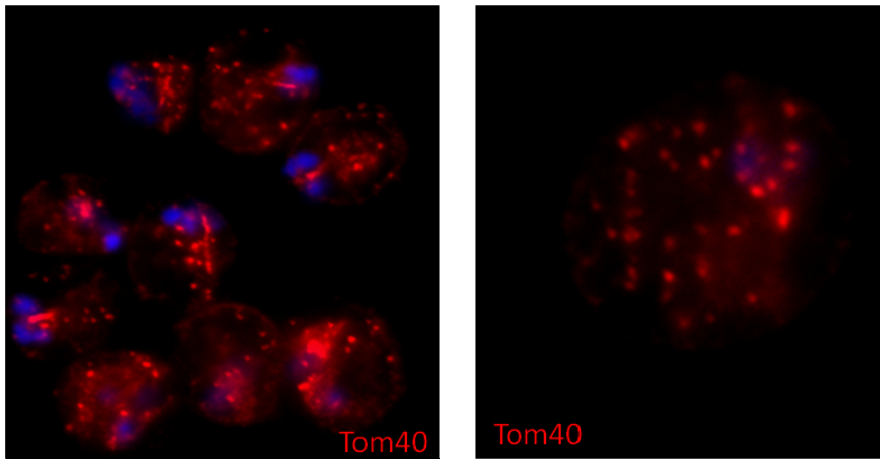
Obrázek 23: Lokalizace *GiSec20* v buňkách kmene *Gi_Sec20_HA_3'UTR* nepřímou imunofluorescencí. A, B, C, D, červený signál overexprimovaného *GiSec20* značeného anti-HA protilátkou kolokalizuje se zeleným signálem anti-*GiPDI* protilátky. DNA je značena modře (DAPI). DIC znázorňuje buňky pod diferenciálním kontrastem. Na snímcích je patrná atypická distribuce endoplazmatického retikula, zesíťování jeho cisteren vedoucí až k masivní fúzi celé organely.

5.4 Lokalizace *GiSec20* v cystách *G. intestinalis*

Cysty *G. intestinalis* byly poskytnuty Mgr. Klárou Jirákovou (Oddělení Tropicke medicíny 1.LF UK). Metodou imunofluorescence byla na fixovaných cystách pozorována lokalizace *GiSec20* pomocí anti-*GiSec20* protilátky. Vzhledem k předpokládané lokalizaci proteinu do endoplazmatického retikula byla jako markerový protein použita anti-*GiPDI* protilátka (**obrázek 24**). Z pozorované distribuce obou signálů vyplývá, že *GiSec20* je v cystách *G. intestinalis*, stejně jako v trofozoitech, lokalizován v endoplazmatickém retikulu. Pro ilustraci je uveden obrázek lokalizace *GiTom40* značícího mitosomy v cystách *G. intestinalis* (**obrázek 25**). Rozdíl v distribuci obou buněčných kompartmentů je očividný.



Obrázek 24: Lokalizace *GiSec20* v cystách *G. intestinalis*. Zelená barva ukazuje lokalizaci markerového proteinu endoplazmatického retikula PDI. Červená barva značí *GiSec20*. Na překryvu obrázků je patrná kolokalizace. Podle pozorované distribuce obou signálů lze soudit, že *GiSec20* je v cystách *G. intestinalis* lokalizován v endoplazmatickém retikulu. Proteiny byly značeny specifickými protilátkami. Modrá barva značí DNA (DAPI). DIC znázorňuje cysty pod diferenciálním kontrastem.



Obrázek 25: Lokalizace *Gi*Tom40 v cystách *G. intestinalis*. Obrázek slouží jako ilustrace pro srovnání rozložení mitosomů a endoplazmatického retikula v cystách *G. intestinalis*. *Gi*Tom40 byl značen anti-*Gi*Tom40 protilátkou (červená barva). Modrá barva značí DNA (DAPI).

6 Diskuze

6.1 Sec20 *Giardia intestinalis*

Sec20 u eukaryot je typický SNARE protein zajišťující transport váčků mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho systémem. V buňkách je tudíž lokalizován v těchto organelách (Sweet and Pelham, 1992). Jedinou známou výjimkou byl doposud Sec20 *Giardia intestinalis* lokalizovaný metodou episomální exprese v redukováných mitochondriích - mitosomech (Elias *et al.*, 2008a). Tato unikátní publikovaná distribuce vyvolala náš zájem o studium funkce *GiSec20* v souvislosti s biogenezí mitosomů a endomembránového systému tohoto evolučně velmi zajímavého parazitického prvoka.

6.2 Buněčná lokalizace *GiSec20*

Vzhledem k typické SNARE primární struktuře *GiSec20* (N-terminální SNARE doména a C-koncová transmembránová doména) se dala očekávat přirozená lokalizace proteinu v endoplazmatickém retikulu. Nicméně publikace (Elias *et al.*, 2008a) navrhuje možnou mitosomální distribuci proteinu (autoři nepoužili žádný mitosomální marker pro definitivní potvrzení lokalizace). Z tohoto důvodu byla vytvořena specifická polyklonální protilátka namířená proti solubilní části proteinu, která je s největší pravděpodobností exponovaná do cytosolu buňky. Tato protilátka na western blotu buněčného lyzátu *G. intestinalis* rozeznává pouze jeden protein o velikosti přibližně 24kDa, což odpovídá teoretické velikosti *GiSec20* (Elias *et al.*, 2008a). Extrakcí uhličitanem sodným bylo potvrzeno membránové ukotvení proteinu. Imunofluorescenční značení však nepotvrdilo mitosomální distribuci proteinu a naopak odhalilo zcela jasnou kolokalizaci signálů *GiSec20* se signálem markeru endoplazmatického retikula *GiPDI*. *GiSec20* je tedy za fyziologických podmínek lokalizován výhradně do endoplazmatického retikula, stejně jako je tomu u Sec20 ostatních eukaryot. Pro potvrzení lokalizace *GiSec20* v endoplazmatickém retikulu bylo provedeno imunofluorescenční značení různě fixovaných trofozoitů i cyst. Nicméně v žádném z těchto pokusů nebyla zjištěna ani částečná přítomnost *GiSec20* v mitosomech.

6.3 Targetovací informace *GiSec20*

Vzhledem ke zjištěným rozdílům v distribuci *GiSec20* byla další částí projektu analýza vlastní targetovací informace *GiSec20*. Jako pro ostatní zástupce rodiny “tail-anchored“ proteinů byla předpovězena přítomnost targetovacího signálu *GiSec20* v jeho TMD na C-konci. Podobně je tomu například u syntaxinu 5, jednoho ze SNARE proteinů savčích buněk, jehož TMD je schopna targetovat různé připojené proteiny do místa specifické lokalizace nativního syntaxinu 5 (Kasai and Akagawa, 2001). Také lokalizace cytochromu b5 může být specificky ovlivňována modifikací jeho C-konce (Kuroda *et al.*, 1998). Rozhodujícím faktorem pro targetování “tail-anchored“ proteinů je přítomnost kladně nabitých aminokyselin (Borgese *et al.*, 2001) a, jak bylo ukázáno na podjednotce mitochondriální translokázy Tom5, délka vlastní membránové kotvy (Horie *et al.*, 2002). Analýzou primární sekvence proteinu a následnými pokusy *in situ* a *ex situ* systému bylo potvrzeno, že C-koncová TMD nese mitosomální targetovací informaci, která může být rozeznána také jako signál pro integraci do mitochondrií. Přítomnost slabého signálu v endoplasmatickém retikulu *G. intestinalis* v pokusech s GFP ukazuje případný vliv reportérové solubilní domény na výsledné lokalizaci proteinové chiméry. Pro přesnější charakterizaci targetovacího signálu bude zapotřebí zavést bodové mutace do specifických pozitivně nabitých aminokyselin C-konce *GiSec20*, případně také prodloužit jeho transmembránovou doménu, jako bylo provedeno ve výše uvedených publikacích.

6.4 Změna lokalizace *GiSec20* při overexpresi

Jak je tedy možné, že přes jednoznačné targetovací signály zjištěné při bioinformatické analýze *GiSec20*, navíc experimentálně ověřené, je protein za fyziologických podmínek lokalizován v endoplasmatickém retikulu? I přes silnou experimentální podporu jsme pro jistotu ověřili, že se nejedná o artefakt způsobený přítomností HA/GFP tagu. Pro toto ověření jsme vytvořili konstrukt, který žádný tag nenese. Nepřímá imunofluorescence ukázala, že *GiSec20* je i bez tagu lokalizován do mitosomů a tudíž proteinový tag nemá přímý vliv na lokalizaci.

Další příčinou mitosomální lokalizace *GiSec20* mohla být masivní overexprese proteinu. Pokud by tomu tak bylo, očekávali bychom nejprve zahlcení povrchu endoplasmatického retikula proteinem, až poté jeho translokaci do mitosomů. Provedené experimenty však ukazují, že overexprimovaný protein je lokalizován pouze a výhradně v mitosomech, zatímco jaderně kódovaný *GiSec20* “zůstává“ v endoplasmatickém retikulu.

Pokud změna hladiny exprese *GiSec20* neovlivňuje jeho lokalizaci, co je tedy zodpovědné za jeho targetování do mitosomů? Jediným možným vysvětlením musí být molekulární odlišnost přirozeného a rekombinantního (i) genu, (ii) mRNA či (iii) proteinu. Možnosti (i) a (iii) můžeme s určitou pravděpodobností vyloučit, neboť sekvence rekombinantního genu/proteinu byla shodná s jaderně kódovaným genem/proteinem a případná odlišnost způsobená různou postranlační modifikací proteinů by se projevila při separaci na SDS PAGE. Zaměřili jsme se proto na možnou odlišnost odvozených mRNA molekul, přesněji na vliv jejich 3'UTR oblastí. Bylo totiž ukázáno, že 5'UTR mRNA jsou u *G. intestinalis* extrémně krátké (pouze několik bází) a nemohou z toho důvodu hrát významnou roli v regulaci genové exprese (Vanacova *et al.*, 2003). Naší pracovní hypotézou proto byla možná účast 3'UTR na lokalizaci mRNA, potažmo přeloženého proteinu.

Řada publikací se věnuje problematice targetování mRNA u *S. cerevisiae* (Gerber *et al.*, 2004; Eliyahu *et al.*, 2010). Lokalizace mRNA může být řízena vazbou její 3'UTR na PUF proteiny, které tak vymezují jednotlivé populace mRNA molekul a ovlivňují tak jejich stabilitu a účinnost translace. Navržen byl i model pro funkci PUF proteinů v indukci kotranslačního importu proteinů na úkor importu posttranslačního (Quenault *et al.*, 2011). Naš další experiment se tedy zakládal na předpokladu, že při expresi *GiSec20* bez přirozené 3'UTR je targetování proteinu řízeno signálem obsaženým v jeho C-koncové části. Tento signál však buňka nemá k dispozici, pokud je protein držen v blízkosti membrány endoplazmatického retikula díky specifické sekvenci v 3'UTR. V případě exprese *GiSec20* s jeho 3'UTR by tedy protein měl zůstat v endoplazmatickém retikulu. Tato domněnka byla částečně potvrzena naším experimentem s expresí *GiSec20* obsahující navíc 3'UTR. Veškerý protein byl lokalizován v endoplazmatickém retikulu. Je tedy možné, že u *G. intestinalis* funguje podobný mechanismus jako u *S. cerevisiae*. Navíc však možná interakce 3' UTR s RNA-vazebným proteinem nejenom reguluje expresi genu, ale i naprosto zásadním způsobem ovlivňuje konečnou lokalizaci proteinu.

Nicméně je zapotřebí zjistit ještě mnoho neobjeveného, abychom mohli tento předpoklad potvrdit. Jako první je třeba identifikovat specifický motiv v 3'UTR *GiSec20* zodpovědný za navrženou interakci s RNA-vazebným proteinem a posléze charakterizovat vlastní proteinový aparát. Naším hlavním cílem pro nejbližší budoucnost je sledování lokalizace mRNA v *G.intestinalis in situ* a případná celková identifikace rozsahu fenoménu regulace lokalizace mRNA.

Celkově je existence RNA-dependentního mechanismu distribuce proteinů u organismu jako je *G. intestinalis* velice vzrušující, a to i z hlediska evoluce proteinové transportu u

eukaryot, u kterých došlo k transformaci poměrně jednoduchého prokaryotického kompartmentu na membránově strukturovanou buňku.

6.5 Zvýšení hladiny exprese *GiSec20* způsobuje agregaci/fúzi buněčných kompartmentů

Díky použití silného OCT promotoru přítomného ve vektoru pOCT-PP2Aas jsme docílili mnohonásobného zvýšení hladiny exprese *GiSec20*. Toto masivní zvýšení zapříčinilo agregaci/fúzi buněčných kompartmentů. V případě mitosomální lokalizace proteinu vedla overexprese ke zfúzování/agregaci organel v extrémním případě až do jedné kompaktní struktury. V případě endoplazmatického retikula se v buňce vyskytovaly atypické struktury. V obou případech došlo k dramatickému snížení schopnosti růstu trofozoitů *G. intestinalis*. Naše výsledky jsou srovnatelné s některými publikacemi, jako je (Hatsuzawa *et al.*, 2000), kde při zvýšení hladiny exprese SNARE proteinu syntaxin 18 v savčích buňkách došlo k masivní agregaci endoplazmatického retikula. Obdobného fenotypu bylo také dosaženo při změnách hladiny exprese cytochromu b5 (Snapp *et al.*, 2003). Takto vzniklé struktury (tzv. OSER - organised smooth endoplasmic reticulum) byly pozorovány za fyziologických podmínek, například (Abran and Dickson, 1992; Gong *et al.*, 1996), i způsobené overexpresí proteinů endoplazmatického retikula, např. Wright *et al.*, 1990; Takei *et al.*, 1994; Sandig *et al.*, 1999). V našem případě však došlo k agregaci nejen u endoplazmatického retikula, ale i mitosomů. Analogický experiment byl proveden v rostlinných buňkách, kde část peroxisomálního “tail-anchored“ proteinu spojená s GFP tagem při špatné lokalizaci indukovala agregaci membrán (Lisenbee *et al.*, 2003). Ačkoli všechny zde uvedené práce uvádějí jako důsledek experimentů agregaci organel, v našem případě není jasné, zda se jedná o agregaci či fúzi. Jelikož je *GiSec20* SNARE, je možné, že by při zvýšení hladiny exprese přímo způsoboval fúzi. Nicméně v dostupných publikacích se uvádí, že k úspěšné fúzi je zapotřebí všech 4 typů SNARE proteinů, tedy Qa, Qb, Qc i R. Proto není jasné, jak by fúze způsobená jediným Qb-SNARE proteinem mohla probíhat. Pro rozlišení, zda se v našem případě jedná o agregaci či fúzi endoplazmatického retikula, respektive mitosomů, je zapotřebí provést transmisní elektronovou mikroskopii struktur vznikajících v buňkách *G. intestinalis*.

7 Závěr

V této práci byl charakterizován homolog SNARE proteinu Sec20 u *G. intestinalis*. Bylo zjištěno, že se tento homolog, stejně jako u ostatních organismů eukaryotické říše, za fyziologických podmínek nachází v endoplazmatickém retikulu. Tato lokalizace byla potvrzena i v cystách prvoka. Při episomální expresi celého genu *sec20* s HA tagem i bez něj je však protein importován do mitosomů *G. intestinalis*, respektive mitochondrií *S. cerevisiae*.

Na základě těchto nesrovnalostí v lokalizaci *GiSec20* byla provedena bioinformatická analýza targetovacího signálu. Ta ukázala přítomnost tohoto signálu v C-koncové části proteinu a jeho charakter typický pro proteiny vnější mitochondriální membrány. Při připojení GFP tagu k C-koncové části *GiSec20* byl tag lokalizován převážně v mitosomech, částečně však i v endoplazmatickém retikulu.

Importu *GiSec20* do mitosomů při episomální expresi bylo zabráněno přidáním přirozené 3'UTR sekvence. Tyto výsledky naznačují možnou přítomnost molekulárního mechanismu zodpovědného za targetování proteinu již na úrovni mRNA.

Vzhledem k časové náročnosti projektu nebyly provedeny imunoprecipitační experimenty pro charakterizaci vazebných partnerů *GiSec20*.

8 Seznam zkratek

3'UTR - 3' nepřekládaná oblast mRNA

Fzo1p - GTPáza vnější mitochondriální membrány

GFP - Green fluorescent protein sloužící jako proteinový tag

Gi_GFP_A - Kmen *G. intestinalis* exprimující C-koncovou část *GiSec20* značenou GFP tagem

Gi_Sec20 - Kmen *G. intestinalis* exprimující *GiSec20*

Gi_Sec20_HA - Kmen *G. intestinalis* exprimující *GiSec20* značený HA tagem

Gi_Sec20_HA_3'UTR - Kmen *G. intestinalis* exprimující *GiSec20* s připojenou 3' nepřekládanou oblastí značený HA tagem

GiPDI - protein-disulfid-izomeráza *G. intestinalis*, marker endoplazmatického retikula

GiSec20 - *Sec20 G. intestinalis*

GiTom40 - Tom40 *G. intestinalis*, mitosomální marker

HA tag - hemaglutininový proteinový tag

HR1/2 - části GTPáz vnější mitochondriální membrány Mfn1/2 obsahující sedmičlenné repetice

l-Mgm1p - dlouhá forma GTPázy vnitřní mitochondriální membrány

Mfn1/2 - savčí homology Fzo1p, GTPázy vnější mitochondriální membrány

Mgm1p - GTPáza vnitřní mitochondriální membrány

NSF - N-ethylmaleimid sensitive factor

NSF ATPáza - NEM sensitive factor, funguje při rozpadu SNARE komplexu

OPA1 - savčí homolog Mgm1p, GTPáza vnitřní mitochondriální membrány

PARL - savčí homolog Pcp1p, proteáza v mezimembránovém prostoru mitochondrie

Pcp1p - proteáza v mezimembránovém prostoru mitochondrie

PUF proteiny - rodina RNA vázajících proteinů

Puf1p-Puf5p - RNA vázající proteiny u *S. cerevisiae*

Q(a,b,c)-SNARE - podrodiny SNARE proteinů

R-SNARE - podrodina SNARE proteinů

RBPs - RNA vázající proteiny

s-Mgm1p - krátká forma GTPázy vnitřní mitochondriální membrány

Sc_GFP - Kmen *S. cerevisiae* exprimující *GiSec20* značený GFP tagem

Sec20 - SNARE protein fungující při transportu váčků mezi endoplazmatickým retikulem a Golgiho systémem

SNAP - NSF attachment protein

SNAREs - SNAP receptors, proteiny zodpovědné za membránovou fúzi

TMD - Transmembránová doména proteinu

Ugo1p - protein mezimembránového prostoru propojující obě GTPázy při mitochondriální fúzi

VAMPs - vesicle associated membrane proteins, jedna z podrodin SNARE proteinů

9 Seznam použité literatury

Abran,D. and Dickson,D.H. (1992). Biogenesis of myeloid bodies in regenerating newt (*Notophthalmus viridescens*) retinal pigment epithelium. *Cell Tissue Res.* 268, 531-538.

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

Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, 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.

Anton,F., Fres,J.M., Schauss,A., Pinson,B., Praefcke,G.J., Langer,T., and Escobar-Henriques,M. (2011). Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J. Cell Sci.* 124, 1126-1135.

Antonin,W., Fasshauer,D., Becker,S., Jahn,R., and Schneider,T.R. (2002). Crystal structure of the endosomal SNARE complex reveals common structural principles of all SNAREs. *Nat. Struct. Biol.* 9, 107-111.

Balch,W.E., Dunphy,W.G., Braell,W.A., and Rothman,J.E. (1984). Reconstitution of the transport of protein between successive compartments of the Golgi measured by the coupled incorporation of N-acetylglucosamine. *Cell* 39, 405-416.

Block,M.R., Glick,B.S., Wilcox,C.A., Wieland,F.T., and Rothman,J.E. (1988). Purification of an N-ethylmaleimide-sensitive protein catalyzing vesicular transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 85, 7852-7856.

Bock,J.B., Matern,H.T., Peden,A.A., and Scheller,R.H. (2001). A genomic perspective on membrane compartment organization. *Nature* 409, 839-841.

Borgese,N., Brambillasca,S., and Colombo,S. (2007). How tails guide tail-anchored proteins to their destinations. *Curr. Opin. Cell Biol.* 19, 368-375.

Borgese,N., Gazzoni,I., Barberi,M., Colombo,S., and Pedrazzini,E. (2001). Targeting of a tail-anchored protein to endoplasmic reticulum and mitochondrial outer membrane by independent but competing pathways. *Mol. Biol. Cell* 12, 2482-2496.

Cervený,K.L., Tamura,Y., Zhang,Z., Jensen,R.E., and Sesaki,H. (2007). Regulation of mitochondrial fusion and division. *Trends Cell Biol.* 17, 563-569.

Chan,D.C. (2006). Dissecting mitochondrial fusion. *Dev. Cell* 11, 592-594.

Chen,X., Arac,D., Wang,T.M., Gilpin,C.J., Zimmerberg,J., and Rizo,J. (2006). SNARE-mediated lipid mixing depends on the physical state of the vesicles. *Biophys. J.* 90, 2062-2074.

- 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.
- Clary,D.O., Griff,I.C., and Rothman,J.E. (1990). SNAPs, a family of NSF attachment proteins involved in intracellular membrane fusion in animals and yeast. *Cell* 61, 709-721.
- 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.
- Cormack,B.P., Bertram,G., Egerton,M., Gow,N.A., Falkow,S., and Brown,A.J. (1997). Yeast-enhanced green fluorescent protein (yEGFP)a reporter of gene expression in *Candida albicans*. *Microbiology* 143 (Pt 2), 303-311.
- Dagley,M.J., Dolezal,P., Likic,V.A., Smid,O., Purcell,A.W., Buchanan,S.K., Tachezy,J., and Lithgow,T. (2009). The protein import channel in the outer mitosomal membrane of *Giardia intestinalis*. *Mol. Biol. Evol.* 26, 1941-1947.
- Dawson,S.C., Pham,J.K., House,S.A., Slawson,E.E., Cronembold,D., and Cande,W.Z. (2008). Stable transformation of an episomal protein-tagging shuttle vector in the piscine diplomonad *Spirionucleus vortens*. *BMC. Microbiol.* 8, 71.
- de Brito,O.M. and Scorrano,L. (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456, 605-610.
- Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* 26, 207-210.
- DeVay,R.M., Dominguez-Ramirez,L., Lackner,L.L., Hoppins,S., Stahlberg,H., and Nunnari,J. (2009). Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* 186, 793-803.
- Dietrich,L.E., Boeddinghaus,C., LaGrassa,T.J., and Ungermann,C. (2003). Control of eukaryotic membrane fusion by N-terminal domains of SNARE proteins. *Biochim. Biophys. Acta* 1641, 111-119.
- Dreyfuss,G., Kim,V.N., and Kataoka,N. (2002). Messenger-RNA-binding proteins and the messages they carry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 3, 195-205.
- Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS. (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. (2008b). Characterization of SNAREs determines the absence of a typical Golgi apparatus in the ancient eukaryote *Giardia lamblia*. *J. Biol. Chem.* 283, 35996-36010.

- Eliyahu,E., Pnueli,L., Melamed,D., Scherrer,T., Gerber,A.P., Pines,O., Rapaport,D., and Arava,Y. (2010). Tom20 mediates localization of mRNAs to mitochondria in a translation-dependent manner. *Mol. Cell Biol.* 30, 284-294.
- 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.
- Fasshauer,D., Antonin,W., Margittai,M., Pabst,S., and Jahn,R. (1999). Mixed and non-cognate SNARE complexes. Characterization of assembly and biophysical properties. *J. Biol. Chem.* 274, 15440-15446.
- Fasshauer,D., Bruns,D., Shen,B., Jahn,R., and Brunger,A.T. (1997a). A structural change occurs upon binding of syntaxin to SNAP-25. *J. Biol. Chem.* 272, 4582-4590.
- Fasshauer,D., Otto,H., Eliason,W.K., Jahn,R., and Brunger,A.T. (1997b). Structural changes are associated with soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion protein attachment protein receptor complex formation. *J. Biol. Chem.* 272, 28036-28041.
- Fasshauer,D., Sutton,R.B., Brunger,A.T., and Jahn,R. (1998). Conserved structural features of the synaptic fusion complex: SNARE proteins reclassified as Q- and R-SNAREs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 95, 15781-15786.
- Filippini,F., Rossi,V., Galli,T., Budillon,A., D'Urso,M., and D'Esposito,M. (2001). Longins: a new evolutionary conserved VAMP family sharing a novel SNARE domain. *Trends Biochem. Sci.* 26, 407-409.
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *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.
- 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.
- Gerber,A.P., Herschlag,D., and Brown,P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytologically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS. Biol.* 2, E79.
- Gong,F.C., Giddings,T.H., Meehl,J.B., Staehelin,L.A., and Galbraith,D.W. (1996). Z-membranes: artificial organelles for overexpressing recombinant integral membrane proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 93, 2219-2223.
- Griffin,E.E. and Chan,D.C. (2006). Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. *J. Biol. Chem.* 281, 16599-16606.
- Griparic,L., Kanazawa,T., and van der Bliek,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.
- Hatsuzawa,K., Hirose,H., Tani,K., Yamamoto,A., Scheller,R.H., and Tagaya,M. (2000). Syntaxin 18, a SNAP receptor that functions in the endoplasmic reticulum, intermediate compartment, and cis-Golgi vesicle trafficking. *J. Biol. Chem.* 275, 13713-13720.
- Hazzard,J., Sudhof,T.C., and Rizo,J. (1999). NMR analysis of the structure of synaptobrevin and of its interaction with syntaxin. *J. Biomol. NMR* 14, 203-207.
- 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.
- Herlan,M., Vogel,F., Bornhovd,C., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2003). Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J. Biol. Chem.* 278, 27781-27788.
- 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.
- Hoppins,S., Horner,J., Song,C., McCaffery,J.M., and Nunnari,J. (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J. Cell Biol.* 184, 569-581.
- Hoppins,S., Lackner,L., and Nunnari,J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751-780.
- Horie,C., Suzuki,H., Sakaguchi,M., and Mihara,K. (2002). Characterization of signal that directs C-tail-anchored proteins to mammalian mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* 13, 1615-1625.
- Huang,P., Galloway,C.A., and Yoon,Y. (2011). Control of mitochondrial morphology through differential interactions of mitochondrial fusion and fission proteins. *PLoS. One.* 6, e20655.

- 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.
- Jackson,M.B. and Chapman,E.R. (2006). Fusion pores and fusion machines in Ca²⁺-triggered exocytosis. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 35, 135-160.
- 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.* 33, 934-940.
- Jedelský PL, Doležal P, Rada P, Pyrih J, Smíd O, Hrdý I, Sedinová M, Marcinčíková M, Voleman L, Perry AJ, Beltrán NC, Lithgow T, Tachezy J. (2011) The minimal proteome in the reduced mitochondrion of the parasitic protist *Giardia intestinalis*. *PLoS. One.* 6, e17285.
- Kasai,K. and Akagawa,K. (2001). Roles of the cytoplasmic and transmembrane domains of syntaxins in intracellular localization and trafficking. *J. Cell Sci.* 114, 3115-3124.
- Kaufmann,T., Schlipf,S., Sanz,J., Neubert,K., Stein,R., and Borner,C. (2003). Characterization of the signal that directs Bcl-x(L), but not Bcl-2, to the mitochondrial outer membrane. *J. Cell Biol.* 160, 53-64.
- Keister,D.B. (1983). Axenic culture of *Giardia lamblia* in TYI-S-33 medium supplemented with bile. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77, 487-488.
- Klopper,T.H., Kienle,C.N., and Fasshauer,D. (2007). An elaborate classification of SNARE proteins sheds light on the conservation of the eukaryotic endomembrane system. *Mol. Biol. Cell* 18, 3463-3471.
- Koshiba,T., Detmer,S.A., Kaiser,J.T., Chen,H., McCaffery,J.M., and Chan,D.C. (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305, 858-862.
- Kozlov,M.M. and Markin,V.S. (1983). [Possible mechanism of membrane fusion]. *Biofizika* 28, 242-247.
- Kuroda,R., Ikenoue,T., Honsho,M., Tsujimoto,S., Mitoma,J.Y., and Ito,A. (1998). Charged amino acids at the carboxyl-terminal portions determine the intracellular locations of two isoforms of cytochrome b5. *J. Biol. Chem.* 273, 31097-31102.

- Lauwaet,T., Davids,B.J., Torres-Escobar,A., Birkeland,S.R., Cipriano,M.J., Preheim,S.P., Palm,D., Svard,S.G., McArthur,A.G., and Gillin,F.D. (2007). Protein phosphatase 2A plays a crucial role in *Giardia lamblia* differentiation. *Mol. Biochem. Parasitol.* *152*, 80-89.
- 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.
- Lisenbee,C.S., Karnik,S.K., and Trelease,R.N. (2003). Overexpression and mislocalization of a tail-anchored GFP redefines the identity of peroxisomal ER. *Traffic.* *4*, 491-501.
- Maniatis,T. and Reed,R. (2002). An extensive network of coupling among gene expression machines. *Nature* *416*, 499-506.
- Margittai,M., Fasshauer,D., Pabst,S., Jahn,R., and Langen,R. (2001). Homo- and heterooligomeric SNARE complexes studied by site-directed spin labeling. *J. Biol. Chem.* *276*, 13169-13177.
- Marsden,H.R., Tomatsu,I., and Kros,A. (2011). Model systems for membrane fusion. *Chem. Soc. Rev.* *40*, 1572-1585.
- 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.
- Mazumder,B., Seshadri,V., and Fox,P.L. (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. *Trends Biochem. Sci.* *28*, 91-98.
- McNew,J.A., Sogaard,M., Lampen,N.M., Machida,S., Ye,R.R., Lacomis,L., Tempst,P., Rothman,J.E., and Sollner,T.H. (1997). Ykt6p, a prenylated SNARE essential for endoplasmic reticulum-Golgi transport. *J. Biol. Chem.* *272*, 17776-17783.
- McQuibban,G.A., Saurya,S., and Freeman,M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* *423*, 537-541.
- 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.
- Montecucco,C., Schiavo,G., and Pantano,S. (2005). SNARE complexes and neuroexocytosis: how many, how close? *Trends Biochem. Sci.* *30*, 367-372.
- Motz,C., Martin,H., Krimmer,T., and Rassow,J. (2002). Bcl-2 and porin follow different pathways of TOM-dependent insertion into the mitochondrial outer membrane. *J. Mol. Biol.* *323*, 729-738.
- Mumberg,D., Muller,R., and Funk,M. (1994). Regulatable promoters of *Saccharomyces cerevisiae*: comparison of transcriptional activity and their use for heterologous expression. *Nucleic Acids Res.* *22*, 5767-5768.
- Nichols,B.J., Ungermann,C., Pelham,H.R., Wickner,W.T., and Haas,A. (1997). Homotypic vacuolar fusion mediated by t- and v-SNAREs. *Nature* *387*, 199-202.

- 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.
- Palmer,C.S., Osellame,L.D., Stojanovski,D., and Ryan,M.T. (2011). The regulation of mitochondrial morphology: Intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal.* *23*, 1534-1545.
- 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.
- 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.
- Quenault,T., Lithgow,T., and Traven,A. (2011). PUF proteins: repression, activation and mRNA localization. *Trends Cell Biol.* *21*, 104-112.
- 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.
- Saint-Georges,Y., Garcia,M., Delaveau,T., Jourdren,L., Le,C.S., Lemoine,S., Tanty,V., Devaux,F., and Jacq,C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS. One.* *3*, e2293.
- Sandig,G., Kargel,E., Menzel,R., Vogel,F., Zimmer,T., and Schunck,W.H. (1999). Regulation of endoplasmic reticulum biogenesis in response to cytochrome P450 overproduction. *Drug Metab Rev.* *31*, 393-410.
- Santel,A. and Fuller,M.T. (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J. Cell Sci.* *114*, 867-874.
- Schafer,A., Zick,M., Kief,J., Steger,M., Heide,H., Duvezin-Caubet,S., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2010). Intramembrane proteolysis of Mgm1 by the mitochondrial rhomboid protease is highly promiscuous regarding the sequence of the cleaved hydrophobic segment. *J. Mol. Biol.* *401*, 182-193.
- 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.
- 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.
- Snapp,E.L., Hegde,R.S., Francolini,M., Lombardo,F., Colombo,S., Pedrazzini,E., Borgese,N., and Lippincott-Schwartz,J. (2003). Formation of stacked ER cisternae by low affinity protein interactions. *J. Cell Biol.* 163, 257-269.
- 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.
- Sutton,R.B., Fasshauer,D., Jahn,R., and Brunger,A.T. (1998). Crystal structure of a SNARE complex involved in synaptic exocytosis at 2.4 Å resolution. *Nature* 395, 347-353.
- 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.
- Takei,K., Mignery,G.A., Mugnaini,E., Sudhof,T.C., and De,C.P. (1994). Inositol 1,4,5-trisphosphate receptor causes formation of ER cisternal stacks in transfected fibroblasts and in cerebellar Purkinje cells. *Neuron* 12, 327-342.
- Tovar,J., Leon-Avila,G., Sanchez,L.B., Sutak,R., Tachezy,J., van der Giezen,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.
- Valdez-Taubas,J. and Pelham,H. (2005). Swf1-dependent palmitoylation of the SNARE Tlg1 prevents its ubiquitination and degradation. *EMBO J.* 24, 2524-2532.
- van den Bogaart,G., Holt,M.G., Bunt,G., Riedel,D., Wouters,F.S., and Jahn,R. (2010). One SNARE complex is sufficient for membrane fusion. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17, 358-364.
- Vanacova,S., Liston,D.R., Tachezy,J., and Johnson,P.J. (2003). Molecular biology of the amitochondriate parasites, *Giardia intestinalis*, *Entamoeba histolytica* and *Trichomonas vaginalis*. *Int. J. Parasitol.* 33, 235-255.
- Vogel,F., Bornhovd,C., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* 175, 237-247.

Weimbs,T., Mostov,K., Low,S.H., and Hofmann,K. (1998). A model for structural similarity between different SNARE complexes based on sequence relationships. *Trends Cell Biol.* 8, 260-262.

Wickens,M., Bernstein,D.S., Kimble,J., and Parker,R. (2002). A PUF family portrait: 3'UTR regulation as a way of life. *Trends Genet.* 18, 150-157.

Wright,R., Keller,G., Gould,S.J., Subramani,S., and Rine,J. (1990). Cell-type control of membrane biogenesis induced by HMG-CoA reductase. *New Biol.* 2, 915-921.

Yang,B., Gonzalez,L., Jr., Prekeris,R., Steegmaier,M., Advani,R.J., and Scheller,R.H. (1999). SNARE interactions are not selective. Implications for membrane fusion specificity. *J. Biol. Chem.* 274, 5649-5653.

Zamore,P.D., Williamson,J.R., and Lehmann,R. (1997). The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *RNA.* 3, 1421-1433.

Zick,M., Duvezin-Caubet,S., Schafer,A., Vogel,F., Neupert,W., and Reichert,A.S. (2009). Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* 583, 2237-2243.