

## STRESZCZENIE

Mitochondria tworzą w komórce dynamiczną sieć, która ulega ciągłym procesom fuzji i fragmentacji. Fragmentacja mitochondriów jest elementem wielu istotnych procesów komórkowych, do których między innymi należą mitoza, apoptoza czy mitofagia. Głównym białkiem biorącym udział w tym procesie jest Drp1 (ang. *dynamamin related protein 1*). Białko to posiada zdolność oligomeryzacji, dzięki czemu tworzy na powierzchni błon mitochondrialnych spiralne struktury, które w wyniku hydrolizy GTP zaciskają się i przerywają integralność błon prowadząc do fragmentacji mitochondrium. Proces ten jest ściśle regulowany poprzez różne mechanizmy, głównie za pośrednictwem kontroli aktywności białka Drp1. Praca ta przedstawia obecny stan wiedzy na temat fragmentacji mitochondriów ze szczególnym uwzględnieniem roli i regulacji aktywności Drp1 w tym procesie.

## WPROWADZENIE

Mitochondria stanowią złożoną strukturę komórkową, która tworzy skomplikowaną sieć wzajemnych połączeń oraz jest zaangażowana w regulację wielu procesów komórkowych takich jak synteza ATP, apoptoza lub buforowanie poziomu jonów wapnia w komórce [1]. Ewolucyjnie mitochondria powstały w drodze wchłonięcia komórek  $\alpha$ -proteobakterii przez prekursora dzisiejszej komórki eukariotycznej, w wyniku czego powstała struktura komórkowa otoczona podwójną błoną lipidową i dysponująca własnym mitochondrialnym genomem (mtDNA) [1,2]. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej zakotwiczone jest wiele białek pośredniczących w oddziaływaniach z białkami cytoplazmatycznymi, jak również umieszczone są kompleksy i kanały białkowe odpowiadające za transport cząsteczek między cytoplazmą a mitochondrium. Silne połaśdowanie wewnętrznej błony mitochondrialnej zapewnia dużą powierzchnię umożliwiającą wydajne rozmieszczenie znajdujących się w niej kompleksów łańcucha oddechowego. Najbardziej wewnętrzną część mitochondrium stanowi macierz mitochondrialna, w której znajdują się między innymi rybosomy oraz mtDNA. Pomędzy wewnętrzną i zewnętrzną błoną znajduje się przestrzeń międzybłonowa, w której występują białka regulujące działanie kompleksów łańcucha oddechowego oraz ruch i modyfikacje cząsteczek transportowanych do mitochondriów. Działanie łańcucha oddechowego powoduje wygenerowanie różnicy potencjału elektrochemicznego pomiędzy przestrzenią międzybłonową a macierzą mitochondrialną. Różnica potencjałów zapewnia siłę napędową dla syntezy ATP, umożliwia transport jonów wapnia do macierzy mitochondrialnej oraz jest miarą prawidłowej funkcjonalności mitochondriów. Zaburzenia różnicy potencjałów są zatem sygnałem do naprawy lub wyeliminowania wadliwych mitochondriów [1,3].

Mitochondria posiadają odrębny od jądrowego materiał genetyczny, który występuje w postaci nukleoidów będących kompleksami białek i mtDNA. Rozmiar mtDNA jest dużo mniejszy ( $16 \times 10^3$  par zasad) niż rozmiar genomowego DNA ( $3 \times 10^9$  par zasad), jednak występuje ono w bardzo wielu kopiach i jest rozsiane po całej sieci mitochondrialnej [1]. W części cząsteczek mtDNA występują mutacje i niewłaściwa proporcja prawidłowego i zmutowanego mtDNA może prowadzić do chorób mitochondrialnych [3,4]. Regulacja procesów komórkowych kontrolowanych przez mitochondria jest możliwa dzięki ich dynamicznej strukturze, za którą odpowiadają procesy łączenia (fuzji) oraz separacji (fragmentacji) obszarów sieci mitochondrialnej. W ich wyniku sieć mitochondrialna może podlegać reorganizacji w zależności od warunków, w jakich znajduje się komórka. Procesy fuzji zapewniają dostęp do produktów ekspresji mtDNA dla całej sieci mitochondrialnej oraz naprawę uszkodzonych fragmentów sieci poprzez wymianę składników z innymi jej obszarami [2,5]. Fragmentacja generuje mniejsze mitochondria, które łatwiej mogą podlegać transportowi wzdłuż cytoszkieletu do miejsc o zwiększonym zapotrzebowaniu na energię, co jest szczególnie ważne w komórkach nerwowych [6]. Fragmentacja dodatkowo umożli-

Bernadeta Michalska

Jerzy Duszyński

Jędrzej Szymański✉

Pracownia Bioenergetyki i Błon Biologicznych,  
Instytut Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, Warszawa

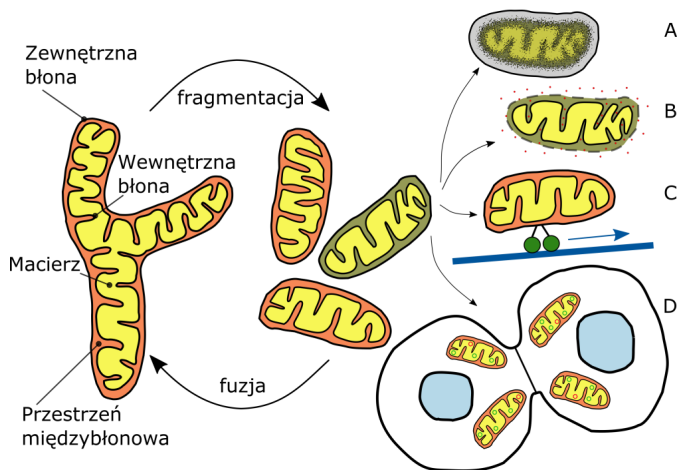
✉Pracownia Bioenergetyki i Błon  
Biologicznych, Instytut Biologii  
Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN, ul.  
Pasteura 3, 02-093 Warszawa;  
tel.: (22) 589 23 45,  
e-mail: j.szymanski@nencki.gov.pl

Artykuł otrzymano 15 maja 2016 r.  
Artykuł zaakceptowano 19 maja 2016 r.

**Słowa kluczowe:** Drp1, fragmentacja mitochondriów, kompleks fragmentujący

**Wykaz skrótów:** Drp1 – dynamin related protein 1; ER – siateczka śródplazmatyczna; Fis1 – fission factor 1; GTP – guanozyna-5'-trifosforan; Mff – mitochondrial fission factor; MiD49 – mitochondrial division protein of 49 kDa; MiD51 – mitochondrial division protein of 51 kDa

**Podziękowania:** Praca powstała w trakcie realizacji projektu badawczego SYMFONIA 2013/08/W/NZ1/00687 finansowanego ze środków przyznanych przez NCN.



**Rycina 1.** Reorganizacja struktury sieci mitochondrialnej jest możliwa dzięki procesom fuzji i fragmentacji. Proces fragmentacji jest niezbędny w wielu procesach komórkowych, takich jak (A) utrzymanie funkcjonalnej sieci mitochondrialnej poprzez eliminację uszkodzonych fragmentów sieci w drodze mitofagii, (B) indukowanie apoptozy w wyniku uwolnienia cytochromu c (lub innych czynników proapoptotycznych) z przestrzeni międzybłonowej, (C) wydajny transport mniejszych mitochondriów wzdłuż cytoszkieletu do miejsc komórki wykazujących zwiększone zapotrzebowanie na ATP, (D) równomierny rozkład prawidłowego (zielone pierścienie) i zmutowanego (czerwone pierścienie) mtDNA pomiędzy różne obszary sieci powstałe w wyniku fragmentacji oraz równy podział mitochondriów do komórek potomnych. Ostatni aspekt jest niezwykle ważny, gdyż mitochondria nie powstają w komórce *de novo*, lecz są generowane w drodze wzrostu i podziału już wcześniej istniejących, odziedziczonych mitochondriów (biogeneza mitochondriów).

liwia kontrolę jakości mitochondriów poprzez odłączanie niefunkcyjnych fragmentów sieci mitochondrialnej i ich eliminację na drodze mitofagii, inicjowanie apoptozy poprzez uwolnienie białek proapoptotycznych z przestrzeni międzybłonowej mitochondriów (np. cytochromu c), a także równy podział mitochondriów oraz mtDNA do komórek potomnych powstających w drodze podziału komórkowego (Ryc. 1) [3,7,8].

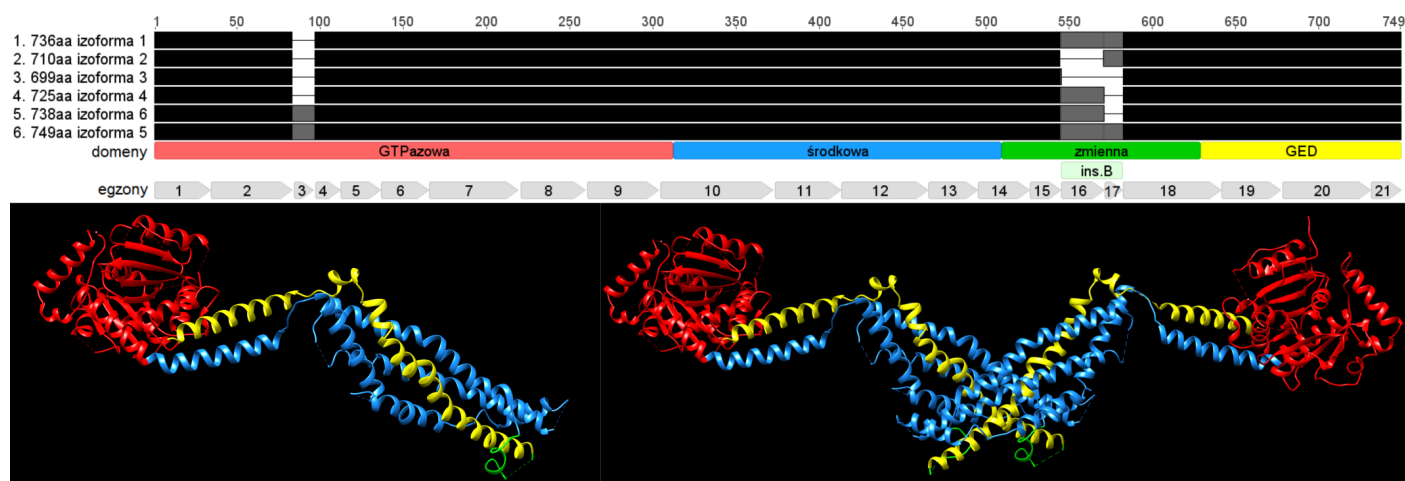
Zaburzenia w procesach fuzji i fragmentacji prowadzą do nieprawidłowego funkcjonowania i morfologii mitochondriów, co ma znaczenie w wielu chorobach neurodegeneracyjnych takich jak choroba Alzheimera, Parkinsona, Huntingtona lub jaskra [1,2,9,10]. Niewłaściwa równowaga między procesami fuzji i fragmentacji mitochondrialnej została także powiązana z patofizjologią chorób metabolicznych, takich jak cukrzyca i otyłość [11]. U prostszych organizmów podział mitochondriów przebiega jeszcze w sposób podobny jak u bakterii, z zaangażowaniem białka FtsZ, które tworzy pierścień od wewnętrznej strony mitochondrium i wyznacza miejsce podziału [1,2]. U wyższych organizmów nastąpiła adaptacja, w wyniku której aparat odpowiedzialny za fragmentację mitochondriów tworzy się na zewnętrznej błonie mitochondrialnej [1]. Fragmentacja mitochondriów jest złożonym procesem podlegającym precyzyjnej regulacji, w którego przebieg zaangażowane są inne struktury komórkowe i liczne białka, a wśród nich najważniejszą rolę pełni Drp1 będące produktem genu DNML1 [12].

### BIAŁKO Drp1

Białko Drp1 należy do rodziny dynamin, grupy białek o podobnej strukturze, ale różnorodnych funkcjach, które wykazują aktywność GTPazową i biorą udział w procesach wymagających przebudowy struktur błonowych [13]. Drp1 pośredniczy nie tylko we fragmentacji mitochondriów, ale także we fragmentacji peroksyosomów [14].

### DOMENY

Drp1, podobnie jak pozostałe białka z rodziny dynamin, posiada budowę domenową, w której skład wchodzi 4 domeny: GTPazowa (na N-końcu), środkowa (ang. *middle domain*), zmienna (VD, ang. *variable domain*) zawierająca insert B oraz domena efektorowa dla GTPazy (GED, ang. *GTPase effector domain*) (Ryc. 2) [15]. Część źródeł domenę zmienną nazywa domeną B, podczas gdy inne pozostają



**Rycina 2.** Porównanie sekwencji izoform Drp1 (górny rysunek): przedstawiono sześć izoform, różniących się występowaniem wybranych eksonów (nr 3,16,17): izoforma 1 (736 aa, NP\_036192), izoforma 2 (710 aa, NP\_036193), izoforma 3 (699 aa, NP\_005681), izoforma 4 (725 aa, NP\_001265392), izoforma 5 (749 aa, NP\_001265393), izoforma 6 (738 aa, NP\_001265394). Poniżej izoformy 5 zaznaczono kolorami fragmenty sekwencji białka Drp1 odpowiadające jego różnym domenom. Eksony zaznaczono kolorem szarym w najniższym rzędzie. Na schemacie pominięto najkrótszą izoformę 7 (533 aa), która powstaje z wykorzystaniem alternatywnego kodonu start. Struktura Drp1 (dolny rysunek) - przedstawienie budowy domenowej dla monomeru (po lewej) oraz dimeru (po prawej) na podstawie struktury krystalograficznej białka Drp1 (4BEJ, PDB). Kolory odpowiadają domenom zgodnie z opisem na górnym rysunku. Tylko fragment domeny zmiennej nie jest widoczny w strukturze krystalograficznej, gdyż został w dużej części usunięty z białka rekombinowanego w celu uzyskania kryształów białka.

przy określeniu „domena zmienna” i wyróżniają w tym rejonie fragment zwany insertem B i właśnie to nazewnictwo będzie używane w niniejszym artykule. Domeny GTPazowa, środkowa oraz GED występują u wszystkich białek z rodziny dynamin, natomiast domena zmienna jest charakterystyczna tylko dla Drp1 [16] i jest rejonem odgrywającym istotną rolę w regulacji aktywności tego białka, co zostanie szerzej opisane. Rolą domeny GTPazowej jest hydroliza GTP, a domena GED wiąże się z domeną GTPazową, przez co stymuluje jej aktywność [12]. Domena środkowa bierze udział w formowaniu się Drp1 w dimery, tetrametry oraz struktury wyższego rzędu [12].

## IZOFORMY

Produkty genu DNM1L podlegają alternatywnemu splicingowi w trzech eksonach (eksony 3, 16, 17) spośród 21 kodujących białko Drp1 [17]. Ekson 3 koduje fragment domeny GTPazowej, a eksony 16 i 17 kodują rejon insertu B (Ryc. 2). Większość poszczególnych izoform Drp1 różni się pomiędzy sobą liczbą aminokwasów występującą w insercie B w domenie zmiennej, stąd też wzięła się nazwa tej domeny. Alternatywny splicing Drp1 w trzech eksonach daje możliwość istnienia  $2^3 = 8$  izoform tego białka [17], z czego według bazy sekwencji referencyjnych ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), ludzki gen: DNM1L) wyróżnia się 7 izoform. Jedną spośród tych 7 izoform (izoforma 2, Ryc. 2) oprócz zdolności do interakcji z mitochondriami, jest w stanie oddziaływać także z mikrotubulami. Alternatywny splicing Drp1 wpływa więc na lokalizację tego białka w komórce i zależy także od rodzaju komórek. Badania przeprowadzone na myszach wykazały, że na przykład wzór ekspresji izoform Drp1 w mózgu jest całkowicie inny od wzoru ekspresji genów kodujących izoformy tego białka w nerkach [17]. Poszczególne izoformy Drp1 mają więc różne znaczenie funkcjonalne dla komórek. Wielkość izoform Drp1 występuje w zakresie od 699 do 749 reszt aminokwasowych, co daje masę około 80 kDa.

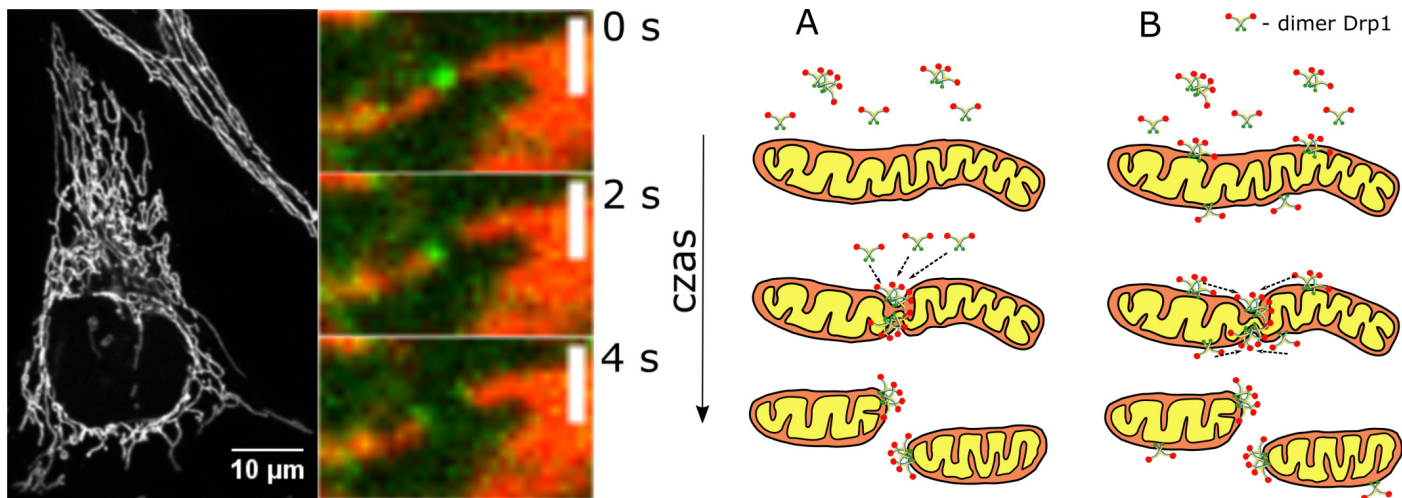
## STRUKTURY OLIGOMERYCZNE DRP1

Drp1 jest białkiem cytosolowym, przy czym znaczna część tego białka występuje na powierzchni mitochondriów [18]. Cechą charakterystyczną Drp1 jest zdolność do oligomeryzacji, co jest niezbędne do uformowania struktury umożliwiającej fragmentację mitochondriów. Jak do tej pory nie wiadomo jakie dokładnie struktury Drp1 tworzy w cytosolu. Na podstawie badań *in vitro* z użyciem białka rekombinowanego sugeruje się, że mogą to być dimery i/lub tetrametry [19-21]. Nie wiadomo także, jakie struktury Drp1 są rekrutowane na powierzchnię mitochondriów. Jeden z modeli proponuje, że jedynie dimery są zdolne do przyłączania się do mitochondriów i tworzenia na ich powierzchni funkcjonalnych struktur spiralnych. Zaproponowano także, że poza dimerami i/lub tetramerami Drp1 tworzy w cytosolu także większe oligomery, które mogą służyć jako rezerwuuar, z którego w razie potrzeby odłączane są dimery zdolne do udziału we fragmentacji mitochondriów [22]. Wiadomo natomiast, że Drp1 jest w stanie tworzyć stabilne dimery, które w warunkach fizjologicznych są najmniejszą jednostką funkcjonalną tego białka. W celu utworzenia oligomerów wyższego rzędu, dimery Drp1 oddzia-

lują poprzez inne reszty aminokwasowe niż ma to miejsce w przypadku tworzenia dimeru [15]. Zaobserwowano, że tworzenie określonych struktur przez Drp1 (dimerów lub tetramerów) zależy od izoformy w jakiej Drp1 występuje. Najkrótsza izoforma Drp1 (izoforma 3, 699 aa, brak insertu B, Ryc. 2) w warunkach *in vitro* tworzy oligomery wyższych rzędów poprzez dołączanie kolejnych dimerów [22]. Natomiast najdłuższa izoforma Drp1 (izoforma 5, 749 aa) występuje w roztworze w postaci raczej jednolitej populacji, składającej się głównie z tetramerów. Oznacza to więc, że w roztworze następuje hamowanie tworzenia oligomerów wyższego rzędu przez izoformę 5 Drp1, co nie ma miejsca w przypadku izoformy 3. Obecność insertu B jest zatem negatywnym regulatorem tworzenia funkcjonalnych oligomerów przez Drp1 w warunkach *in vitro*. Jedną z grup badawczych zaproponowała, że zróżnicowane zdolności do tworzenia oligomerów przez różne izoformy Drp1 oraz odmienna geometria oligomerycznych spiral tworzonych na powierzchni błon mogą wykluczać hetero-kopolimeryzację pomiędzy różnymi izoformami podczas ich koekspresji *in vivo* [23]. Jednak wyniki innych badań sugerują, że Drp1 jest w stanie tworzyć heterooligomery pomiędzy różnymi izoformami tego białka [17], co może pozwalać na regulację rozmiaru tworzonych struktur spiralnych.

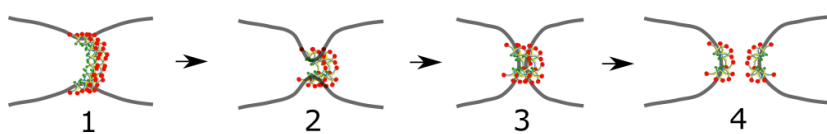
## MECHANIZM DZIAŁANIA DRP1 WE FRAGMENTACJI MITOCHONDRIÓW

Drp1 wykazuje zdolność do oddziaływania z zewnętrzną błoną mitochondrialną. W komórce białko to przemieszcza się pomiędzy cytosolem a siecią mitochondrialną (Ryc. 3), lecz tylko niewielka część populacji tego białka związana w danej chwili z mitochondriami jest zaangażowana w proces fragmentacji [18,24]. Po rekrutowaniu do miejsca fragmentacji białko Drp1 tworzy strukturę spiralną, która oplata mitochondrium i wiąże GTP [16]. Jeden z modeli pokazuje, że to miejsce podziału jest otoczone przez około 48 tetramerów Drp1, a pierścień tworzony przez Drp1 na powierzchni mitochondrium jest podwójną spiralą [15]. Wiązanie GTP do oligomeru Drp1 powoduje jego stabilizację oraz niewielkie zmniejszenie się jego średnicy wynikające z uporządkowania powstałej struktury poprzez zmiany konformacyjne. Następnie ma miejsce hydroliza GTP, która umożliwia wytworzenie się energii mechanicznej potrzebnej do zaciskania się pierścienia Drp1 poprzez dalsze zmiany konformacyjne tego białka, co prowadzi do przerwania fragmentu sieci mitochondrialnej w wyniku reorganizacji struktury błon mitochondrium w tym miejscu [16]. Po fragmentacji oligomer Drp1 ulega rozpadowi na mniejsze elementy, umożliwiając ponowne wykorzystanie białka w tym procesie [25]. Zaobserwowano, że po zakończeniu fragmentacji pewna część Drp1 przez krótki czas pozostaje związana z obydwoma nowopowstałymi końcami mitochondrium (Ryc. 3) [21,26,27]. Na podstawie tych obserwacji wyróżniono 3 typy struktur, które Drp1 tworzy na powierzchni mitochondriów podczas ich fragmentacji: Drp1 związane do mitochondriów w miejscach ich zmniejszonej średnicy; Drp1 związane do mitochondriów po fragmentacji, ale unieruchomionych i wciąż połączonych za pośrednictwem tego białka, oraz Drp1 związane z rozdzielonymi już nowopowstałymi końcami tego organellum (Ryc. 4) [21,27]. To sugeruje, że do



**Rycina 3.** Mitochondria tworzą w komórce złożoną sieć, która może podlegać dynamicznym przekształceniom. Po lewej stronie zdjęcie komórek HeLa wybarwionych barwnikiem mitotracker, mitochondria zaznaczono na biało. Obok, z prawej strony, przykład fragmentacji sieci mitochondrialnej, uchwycony w kilkusekundowych odstępach czasu (0, 2, 4 sekundy). Białko Drp1 oznaczono kolorem zielonym, a mitochondria czerwonym. Skalę (2  $\mu\text{m}$ ) zaznaczono jako biały pasek w górnym prawym rogu każdego zdjęcia. Pomiary wykonano z użyciem stabilnej linii GFP-Drp1 (komórki HeLa Kyoto), w której mitochondria oznakowano wykorzystując białko mito-mNeptune. Po prawej stronie przedstawiono schemat ilustrujący dwa różne modele fragmentacji mitochondriów rozważane w literaturze: (model A) białko Drp1 jest rekrutowane do miejsca podziału bezpośrednio przed zajściem tego procesu, gdzie tworzy pierścień, przy pomocy którego dokonuje się następnie fragmentacja mitochondrium, (model B) białko Drp1 wiąże się na powierzchni mitochondrium, a następnie przemieszcza się po tej powierzchni i tworzy coraz większe kompleksy, które w miejscach podziału mogą doprowadzić do fragmentacji mitochondrium. Niemodyfikowane komórki HeLa Kyoto otrzymano z laboratorium Jana Ellenberga (EMBL Heidelberg) za zgodą prof. Shuh Narumiya z Uniwersytetu w Kyoto. Zdjęcia wykonano przez autorów artykułu przy użyciu mikroskopów Leica SP8 oraz Zeiss Spinning Disc w Pracowni Obrazowania Struktury i Funkcji Tkankowych w Instytucie Nenckiego. Przy otrzymywaniu stabilnej linii GFP-Drp1 korzystano z urządzeń Pracowni Cytometrii Instytutu Nenckiego.

fragmentacji mitochondrium dochodzi pośrodku otaczającej to organelum podwójnej spirali tworzonej przez Drp1 [15,21,26]. Dodatkowo, Drp1 stabilizuje struktury mitochondrium w pośrednich etapach procesu fragmentacji, w których następuje unieruchomienie nowopowstałych końców za pośrednictwem tego białka. Rolą tej stabilizacji może być zmniejszenie energii produktu reakcji fragmentacji, po czym dopiero następuje separacja nowopowstałych końców mitochondrium. W separacji i oddalaniu się od siebie nowych końców mitochondrium bierze udział cytoszkielet komórki [21]. Badania przeprowadzone na drożdżach za pomocą mikroskopii elektronowej wykazały, że średnica mitochondriów w miejscu fragmentacji wynosi około 109 nm i jest to wartość zbliżona do uśrednionego rozmiaru struktury tworzonej przez Dnm1 (odpowiednik Drp1 u drożdży) w roztworze z dodatkiem niezdolnego do hydrolizy analogu GTP [28]. Typowa średnica mitochondriów wynosi od 500 do 1000 nm, co sugeruje, że zanim Drp1 zostanie zrekrutowane do miejsc fragmentacji i utworzy spiralny oligomer, musi przejść proces wstępnego zmniejszenia średnicy mitochondriów do wcześniej wspomnianej wartości wynoszącej około 100 nm [29]. W proces



**Rycina 4.** Etapy fragmentacji mitochondriów z udziałem Drp1. (1) Uformowanie się podwójnej spirali Drp1 na zewnętrznej błonie mitochondrium o wstępnie zmniejszonej średnicy. (2) Zaciśnięcie się spirali Drp1 pod wpływem hydrolizy GTP, co powoduje dalsze zmniejszanie się średnicy mitochondrium w tym miejscu. (3) Powstanie nowych końców sieci mitochondrialnej, które są unieruchomione i stabilizowane za pośrednictwem Drp1. (4) Separacja nowopowstałych końców sieci mitochondrialnej. Część Drp1 pozostaje związana z tymi końcami przez pewien czas.

ten zaangażowane są siateczka śródplazmatyczna i aktyna (Ryc. 5) [30,31], co zostanie szerzej opisane w dalszej części artykułu. W obecności GTP i pod wpływem jego hydrolizy średnica pierścienia tworzonego przez Dnm1 zmniejsza się do około 70 nm, co, jak już wspomniano, jest możliwe dzięki zmianom konformacyjnym powstałego oligomeru [16]. Tworzenie przez Drp1 struktury podwójnej spirali na powierzchni mitochondrium w miejscu fragmentacji prawdopodobnie wynika z tego, że do zaciśnięcia i przerwania integralności podwójnej błony mitochondrium wymagana jest stosunkowo duża siła [15].

Rozważane są różne modele w ramach których może powstawać kompleks odpowiedzialny za fragmentację mitochondrium (Ryc. 3). W pierwszym z nich białko Drp1 jest rekrutowane z cytosolu bezpośrednio do wyznaczonego miejsca podziału na mitochondrium, a następnie po utworzeniu funkcjonalnego pierścienia dochodzi do fragmentacji. Ten model zakłada, że powstawanie kompleksu fragmentującego na mitochondriach następuje poprzez dołączanie dimerów Drp1, które są odłączane za pośrednictwem hydrolizy GTP od większych cytosolowych struktur Drp1 stanowiących rezerwuary tego białka [22]. W drugim modelu Drp1 oddziałuje

z siecią mitochondrialną w różnych miejscach i tworzy oligomery różnych rozmiarów, które łącząc się ze sobą tworzą funkcjonalne spirale zdolne do fragmentacji (Ryc. 3 A i B) [24]. Drugi model mogą potwierdzać nie tylko badania *in vivo* [24], ale również badania przeprowadzone *in vitro*, które sugerują że Drp1 podlega cyklom rozpadania oligomerów i ich ponownego formowania na powierzchni

lipidowej matrycy [25]. Zaobserwowano również, że samo utworzenie pierścienia Drp1 wokół mitochondrium niekoniecznie prowadzi do fragmentacji, która zdaje się wymagać wystąpienia dodatkowych sygnałów, do których może należeć formowanie się filamentów aktynowych w miejscu fragmentacji [24].

#### ROLA DOMENY ZMIENNEJ I INSERTU B

Wiele badań jest prowadzonych na temat wpływu domeny zmiennej i występującego w niej insertu B na oddziaływanie Drp1 z mitochondriami. Obecność lub brak insertu B jak również całej domeny zmiennej w Drp1 ma wpływ na średnicę spiralnych oligomerów tworzonych przez to białko. Z badań przeprowadzonych *in vitro* wynika, że Drp1 z delecją całego fragmentu domeny zmiennej na powierzchni błon formuje się w spiralne polimery o średnicy powyżej 250 nm [25]. Obecność domeny zmiennej, ale bez insertu B, prowadzi do tworzenia spiral Drp1 o średnicy poniżej 200 nm, natomiast obecność tego insertu w cząsteczce Drp1 powoduje zmniejszenie się średnicy tworzonych spiral do wartości poniżej 100 nm [23]. Występowanie insertu B w domenie zmiennej Drp1 jest głównym wyznacznikiem stopnia zakrzywienia powstającej struktury spiralnej i możliwości dopasowania jej do kształtu błony biologicznej podlegającej przekształceniom [23,25]. Zaobserwowano, że obecność insertu B hamuje aktywność GTPazową białka Drp1 [23,26]. Sugeruje się, że ta obniżona aktywność GTPazowa wpływa na zahamowanie procesów fragmentacji mitochondriów poprzez osłabioną zdolność odłączania funkcjonalnych dimerów z rezerwuarów Drp1, co jest procesem zależnym od hydrolizy GTP [22,23]. Delecja całego fragmentu domeny zmiennej powoduje nadmierną aktywność tego białka, które w tym wypadku występuje w roztworze wyłącznie w postaci dimerów [32]. W warunkach sprzyjających oligomeryzacji (w roztworze), brak tej domeny promuje przedwczesne formowanie się Drp1 w większe struktury. Wykazano, że te struktury wyższego rzędu tworzą dobrze uporządkowane filamety [25]. Zaproponowano więc, że domena zmienna wraz insertem B allosterycznie moduluje zdolność tworzenia się oligomerów Drp1, co może mieć rolę w hamowaniu nadmiernej oligomeryzacji Drp1 *in vivo* [23,26]. Badania przeprowadzone w komórkach potwierdzają hipotezę o samohamującej roli pełnionej przez domenę zmienną [26]. Usytuowanie domeny zmiennej w przestrzennej strukturze Drp1 blokuje fragment tego białka, który jest odpowiedzialny za jego oligomeryzację. Domena ta może więc zapobiegać przedwczesnej, nieproduktywnej oligomeryzacji, gdy Drp1 znajduje się w cytosolu. Natomiast na powierzchni mitochondrium oddziaływanie Drp1 z lipidami błony mitochondrialnej może powodować zmianę konformacji tego białka prowadzącą do odsłonięcia fragmentu promującego oligomeryzację, która umożliwia formowanie się funkcjonalnych spiral prowadzących do fragmentacji tego organellum [25]. W związku z tym, że w badaniach *in vitro* brak domeny zmiennej nie wpływa hamująco na tworzenie funkcjonalnych oligomerów Drp1 na powierzchni dwuwarstw lipidowych, wywnioskowano, że mechanoenzymatyczny rdzeń tego białka składający się z domen GTPazowej, środkowej oraz GED jest wystarczającym elementem potrzebnym do zaciśnięcia błon pod wpływem hydrolizy GTP. Domena zmienna pełni natomiast funkcję

regulatorową poprzez kontrolę oligomeryzacji Drp1 zarówno w roztworze jak i na powierzchni błon. Bierze ona udział w procesie osiągania przez oligomery Drp1 prawidłowej geometrii na powierzchni mitochondrium, która w dalszym etapie umożliwi całkowite zaciśnięcie błon prowadzące do ich fragmentacji. Funkcję regulatorową domeny zmiennej może potwierdzać także fakt, że w tej domenie występuje najwięcej miejsc potranslacyjnych modyfikacji Drp1 [15,25].

#### MODYFIKACJE POTRANSLACYJNE DRP1

Drp1 podlega różnego rodzaju modyfikacjom potranslacyjnym, które wpływając na aktywność, lokalizację oraz dynamikę tego białka, odgrywają ważną rolę w regulacji procesu fragmentacji mitochondriów. Jak już wspomniano, większość miejsc potranslacyjnych modyfikacji Drp1 mieści się w domenie zmiennej [15]. Znaczenie modyfikacji potranslacyjnych w regulacji aktywności Drp1 może podkreślać fakt, że zwykła nadekspresja tego białka nie prowadzi do zwiększenia poziomu fragmentacji mitochondriów [33]. Modyfikacje te obejmują fosforylację, sumoilację, ubikwitylację oraz S-nitrozylację.

Spośród wymienionych modyfikacji najwięcej wiadomo o fosforylacji Drp1. Drp1 podlega tej modyfikacji w wielu miejscach, do których należą: reszty seryny 616, 637 oraz 693 (numeracja właściwa dla izoformy 1 Drp1, o długości 736 reszt aminokwasowych), z których pierwsze dwa miejsca zostały najlepiej scharakteryzowane. Fosforylacja reszty seryny 616 przez zależną od cykliny B1 kinazę 1 (Cdk1, ang. *cyclin dependent kinase 1*) powoduje aktywację Drp1 podczas mitozy, co indukuje fragmentację mitochondriów potrzebną do równomiernej dystrybucji tego organellum do komórek potomnych [34]. W warunkach stresu oksydacyjnego aktywuje się inna kinaza – kinaza białkowa Cδ (PKCδ, ang. *protein kinase C δ*), która również pośredniczy w fosforylacji, reszty seryny 616, co powoduje fragmentację oraz nieprawidłowe funkcjonowanie mitochondriów, przez co prowadzi do uszkodzeń mózgu [35]. Poza tym niedawno odkryto, że fosforylacja reszty seryny 616 Drp1 przez kinazę Erk jest niezbędnym, wczesnym etapem procesu indukowanego reprogramowania komórek do komórek pluripotencyjnych [36]. Natomiast fosforylacja reszty seryny 637 przez zależną od cAMP kinazę białkową (PKA, ang. *protein kinase A*) inaktywuje to białko, co ma związek między innymi ze zmniejszeniem podatności komórki na apoptozę [37,38]. PKA fosforyluje zarówno frakcję Drp1 występującą w cytosolu jak i tę na zewnętrznej błonie mitochondrialnej. Fosforylacja cytosolowej frakcji Drp1 zapobiega przemieszczeniu się tego białka do mitochondrium [39]. Natomiast podczas fosforylacji mitochondrialnej frakcji Drp1, białko PKA jest rekrutowane do zewnętrznej błony mitochondrium przez występujące w tej błonie białko AKAP1 (ang. *A kinase anchoring protein 1*), czego skutkiem jest agregacja Drp1 w duże, wolno poruszające się kompleksy, niezdolne do fragmentacji mitochondrium [40]. Fosforylacja reszty seryny 637 Drp1 zachodzi także za pośrednictwem białka CaMK1α (ang. *Ca<sup>2+</sup>/calmodulin-dependent protein kinase I α*) i w przeciwieństwie do fosforylacji za pośrednictwem PKA powoduje stymulację fragmentacji mitochondriów [41]. W fosforylacji reszty seryny 637 Drp1 pośredniczą także białka ROCK1 (ang. *Rho-associated coiled coil-containing protein kina-*

se 1) [42] oraz AMPK (ang. *AMP-activated protein kinase*) [43]. ROCK1 ulega aktywacji podczas hiperglikemii, w wyniku czego białko to fosforyluje Drp1, co prowadzi do fragmentacji mitochondriów, a ostatecznie powoduje nefropatię cukrzycową [42]. Natomiast fosforylacja Drp1 za pośrednictwem AMPK, podobnie jak w przypadku PKA, powoduje zahamowanie fragmentacji mitochondriów, co jest elementem ochrony i poprawy funkcjonowania komórek  $\beta$  trzustki w warunkach stresu metabolicznego [43]. Różnice w zachowaniu Drp1 pod wpływem fosforylacji w tym samym miejscu nie zostały wyjaśnione, jednak mogą one zależeć od parametrów takich jak typ komórki, jej wiek lub status, a także od lokalizacji Drp1 [10]. Defosforylacja reszty seryny 637 przez kalcyneurynę wpływa na wzrost fragmentacji mitochondriów w wyniku aktywacji Drp1 [38,39]. Działanie kalcyneuryny jest zależne od poziomu jonów wapnia w komórce. Gdy poziom tych jonów wzrasta, kalcyneuryna jest aktywowana, co powoduje defosforylację Drp1, a następnie jego translokację do mitochondriów [39]. Fosforylacja reszty seryny 693 Drp1 zachodzi za pośrednictwem kinazy GSK3 $\beta$  (ang. *glycogen synthase kinase 3 $\beta$* ) i powoduje obniżenie aktywności GTPazowej Drp1, co wpływa na zahamowanie fragmentacji mitochondriów i wiąże się z obniżeniem podatności komórek na apoptozę [44].

Inną poznaną modyfikacją potranslacyjną Drp1 jest jego sumoilacja. Sumoilacja jest procesem polegającym na dołączeniu białka SUMO (ang. *small ubiquitin-like modifier*) do białka modyfikowanego. SUMO należą do rodziny ubikwityn i są kowalencyjnie dołączane do białek substratowych poprzez enzymatyczną kaskadę, do której należą enzymy: heterodimer E1, ligaza E2 (białko Ubc9) oraz ligaza E3, która zapewnia specyficzność reakcji i przeprowadza jej końcowy etap. Białkiem będącym ligazą E3 dla SUMO, a występującym w błonie mitochondrialnej jest MAPL (ang. *mitochondrial-anchored protein ligase*) [45]. Sumoilacja Drp1 przez MAPL jest odpowiedzią na wzrost poziomu proapoptotycznych białek Bax/Bak podczas apoptozy, co prowadzi do stabilnego związania się Drp1 z mitochondriami i aktywacji ich fragmentacji [46,47]. Stan sumoilacji Drp1 wynika z dynamicznej równowagi pomiędzy przeciwstawnymi procesami sumoilacji i desumoilacji. W desumoilacji Drp1 pośredniczą proteazy cysteinowe SenP3 oraz SenP5 [48]. Desumoilacja Drp1 przez SenP5 zachodzi przy przejściu komórki z fazy G2 do M podczas mitozy, co powoduje zwiększenie dostępnej puli Drp1 i ułatwia zajęcie fragmentacji mitochondrium mającej na celu równomierną dystrybucję tego organellum do komórek potomnych [49]. Proteaza SenP3 bierze udział w regulacji aktywności Drp1 w warunkach stresu komórkowego. Niski poziom SenP3 pozostawia Drp1 w formie sumoilowanej, co zapobiega uwolnieniu cytochromu c z komórki i apoptozie. Wysoki poziom SenP3 pośredniczy w desumoilacji Drp1, czego wynikiem jest kierowanie tego białka do mitochondriów, gdzie następuje uwolnienie cytochromu c i aktywacja ścieżki apoptozy [50]. Powyższe wyniki badań wskazują, że sumoilacja Drp1 ułatwia bądź hamuje fragmentację mitochondriów i wpływ tej zmiany potranslacyjnej zależy być może od jej lokalizacji w sekwencji Drp1.

Ubikwitynacja jest procesem polegającym na dołączeniu ubikwityny do białka substratowego i tak samo jak w przy-

padku sumoilacji, zachodzi przy udziale kaskady enzymatycznej. W ubikwitynacji Drp1 pośredniczy między innymi ligaza E3 MARCH5, nazywana także MITOL [51,52]. Rola ubikwitynacji Drp1 za pośrednictwem zakotwiczonego w zewnętrznej błonie mitochondrialnej MARCH5/MITOL nie została jednoznacznie określona, gdyż opublikowane jak dotąd wyniki badań są ze sobą niespójne [51-53]. MARCH5/MITOL może regulować przebieg fragmentacji mitochondriów poprzez pełnienie bardziej ogólnej roli, polegającej na ubikwitynacji zmutowanych, nieprawidłowo sfałdowanych lub uszkodzonych białek obecnych na mitochondriach, co prowadzi do ich degradacji w proteasomie [33]. Ostatnio zaproponowano rolę pośredniczącą dla MARCH5 w ubikwitynacji jednego z białek adaptorowych dla Drp1, która poprzez hamowanie fragmentacji mitochondriów ma na celu ochronę komórki przed indukowaną stresem apoptozą [54]. W ubikwitynacji Drp1 pośredniczy także białko Parkin, czego skutkiem jest kierowanie Drp1 na drogę degradacji proteasomalnej. Sugeruje się, że rolą Parkin jest kontrola poziomu Drp1 w komórce, dzięki czemu mitochondria mogą prawidłowo funkcjonować [55].

S-nitrozylacja białka zachodzi w wyniku reakcji tlenku azotu (NO) z grupą -SH cysteiny. NO jest cząsteczką sygnalizacyjną, ale jej nadmiar ma negatywny wpływ na komórkę, a w szczególności na komórki nerwowe, częściowo poprzez powodowanie fragmentacji mitochondriów [56]. Zwiększona synteza NO zachodzi w neuronach osób z chorobą Alzheimera i jest odpowiedzią na nagromadzenie  $\beta$ -amyloidu. S-nitrozylacja reszty cysteiny 644 Drp1 zachodzi w domenie GED i prowadzi do powstania dimerycznej formy SNO-Drp1, a także zwiększa aktywność GTPazową tego białka i zdolność do tworzenia oligomerów. To prowadzi to zwiększonej fragmentacji mitochondriów w neuronach, czego skutkiem jest utrata połączeń synaptycznych i uszkodzenia tych komórek [56]. Wyniki tych badań są jednak kontrowersyjne, ponieważ inna grupa badawcza sugeruje, że S-nitrozylacja Drp1 nie wpływa w żaden sposób na zwiększenie aktywności tego białka [57].

## ZNACZENIE FUNKCJONALNE DRP1

Znaczenie fragmentacji mitochondriów zależnej od Drp1 zbadano w myszy z delecją tego białka oraz w liniach mysich embrionalnych fibroblastów (MEFs, ang. *mouse embryonic fibroblasts*) wyprowadzonych z tych myszy w eksperymentach przeprowadzonych niezależnie przez dwie grupy badawcze [58,59]. Brak ekspresji Drp1 powodował śmierć mysich zarodków po około 12 dniach, co było wynikiem wad rozwojowych, a szczególnie wad przodomózgowia, zaburzeń tworzenia synaps, słabo rozwiniętej wątroby oraz nieprawidłowo funkcjonującego serca [58,59], co wskazuje, że neurony są bardzo wrażliwe na defekty występujące w mitochondriach. Myszy z wyciszoną ekspresją Drp1 tylko w neuronach rodzą się żywe, jednak umierają szybko po urodzeniu w związku z neurodegeneracją [58,59]. Drp1 jest więc niezbędnym białkiem w prawidłowym rozwoju zarodków oraz mózgu u myszy. Pierwotne linie MEF można utrzymać w hodowli komórkowej, jednak rosną one wolniej od komórek kontrolnych, pomimo niezmiennego poziomu ATP [59]. W unieśmiertnionej linii MEF nie zauważono znaczących zmian w poziomach podstawowych

parametrów mitochondrialnych w porównaniu z komórkami kontrolnymi, co sugeruje, że Drp1 nie jest niezbędnym białkiem w przeżywalności i utrzymaniu aktywnych mitochondriów tych komórek [58].

### SKŁADNIKI ZEWNĘTRZNEJ BŁONY MITOCHONDRIALNEJ ODDZIAŁUJĄCE Z DRP1

Wśród składników zewnętrznej błony mitochondrialnej, które bezpośrednio oddziałują z Drp1 oraz pośredniczą w rekrutacji tego białka do miejsc fragmentacji, jak również w samym procesie fragmentacji, wyróżniamy kilka białek oraz specyficzny dla mitochondriów lipid kardiolipinę. Do białek tych zaliczają się: Mff (ang. *mitochondrial fission factor*), Fis1 (ang. *fission factor 1*), MiD49 oraz MiD51 (ang. *mitochondrial division proteins of 49/51 kDa*).

#### MFF

Mff, podobnie jak Drp1, występuje w postaci kilku izoform, których poziom ekspresji zależy od typu komórki [29,60]. Co najmniej 9 wariantów splicingowych tego białka jest kodowanych przez gen MFF, lecz różnice w funkcjonalności tych izoform nie zostały poznane [29]. Mff gromadzi się w odrębnych skupiskach na powierzchni mitochondrium i kolokalizuje z Drp1. C-koniec tego białka jest zakotwiczony w zewnętrznej błonie mitochondrium, a N-koniec bierze udział w interakcji z Drp1 [29,60]. Białko Mff posiada zdolność oligomeryzacji i w roztworze występuje w postaci tetramerów [32]. Oddziaływanie Drp1 z mitochondriami jest zaburzone w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego Mff, co prowadzi do elongacji tego organellum [29,60,61], a nadekspresja genu kodującego Mff powoduje zwiększoną fragmentację mitochondriów, co wskazuje na istotną rolę tego białka w przebiegu tego procesu [60,61]. Mff rekrutuje Drp1 niezależnie od obecności Fis1, gdyż interakcja ta nie jest zaburzona w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego Fis1 [60]. Wykazano, że Mff w różny sposób reaguje z różnymi izoformami Drp1 i wpływa na ich zdolność do hydrolizy GTP. Nadekspresja genu kodującego izoformę 3 Drp1 (brak insertu B) w komórkach z wyciszoną ekspresją genu kodującego endogennej Drp1, powodowała fragmentację mitochondriów w większym stopniu w porównaniu do innych izoform tego białka, nawet przy braku ekspresji Mff [23]. Wskazuje to więc na mniejsze znaczenie Mff we fragmentacji mitochondriów za pośrednictwem izoformy 3 Drp1. W przypadku izoform Drp1 zawierających insert B dodatkowym efektem oddziaływania z Mff jest zwiększenie aktywności GTPazowej Drp1, co ma znaczenie przy indukowaniu zmiany konformacyjnej prowadzącej do zaciśnięcia kompleksu fragmentującego. Mff działa zatem jako allosteryczny regulator aktywności Drp1, jednak stopień tej regulacji zależy od izoformy Drp1 [23]. Uważa się, że Mff jest w stanie oddziaływać z dimerami Drp1, a większe oligomery nie tworzą funkcjonalnych oddziaływań z Mff, co może oznaczać, że tak jak już wcześniej wspomniano, dimery Drp1 są tymi jednostkami strukturalnymi, które są funkcjonalnie aktywne w tworzeniu kompleksu fragmentującego mitochondrium [32]. Głównym zadaniem Mff jest zatem stanowienie rusztowania dla tworzenia oligomerów Drp1 na powierzchni mitochondrium [32]. Inna grupa ba-

dawcza stwierdziła jednak, że Mff jest w stanie selektywnie rekrutować Drp1 w postaci tetramerów lub większych oligomerów [62]. W kilku pracach zaobserwowano, że brak domeny zmiennej lub insertu B wpływa na wzmocnienie oddziaływania pomiędzy Drp1 a Mff [26,32,62]. Z dotychczasowych badań jednoznacznie wynika, że Mff jest jednym z głównych białek pośredniczących w procesie fragmentacji mitochondriów i regulujących aktywność różnych izoform Drp1, jednak dodatkowe badania są potrzebne w celu wyjaśnienia jakie formy oligomeryczne Drp1 są preferowane w oddziaływaniu z Mff.

#### FIS1

Fis1 jest podstawowym białkiem adaptorowym dla Dnm1 u drożdży i wyciszenie jego genu wpływa znacząco na obniżenie poziomu fragmentacji mitochondriów [61]. U ssaków białko to również występuje, jednak nie jest ono niezbędnym elementem w tym procesie. Wyciszenie ekspresji genu tego białka nie wpływa znacząco ani na proces fragmentacji, ani na oddziaływanie Drp1 z mitochondriami lub z peroksysomami [60]. Fis1 mimo wszystko pośredniczy we fragmentacji mitochondriów, jednak w dużo mniejszym stopniu niż ma to miejsce w przypadku Mff [61]. Podobnie jak Mff, białko to jest zakotwiczone w zewnętrznej błonie mitochondrialnej za pośrednictwem C-końca. Ponieważ Fis1 nie tworzy kompleksu z Mff w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, sugeruje to odmienne role tych dwóch białek w procesie fragmentacji mitochondriów [29]. Zaproponowano udział Fis1 we fragmentacji mitochondriów spowodowanej stresem w komórce, która w zależności od czynników stymulujących, może być elementem procesu apoptozy lub mitofagii. Sugeruje się także, że Fis1 pełni swoją funkcję po zainicjowaniu fragmentacji mitochondriów za pośrednictwem interakcji pomiędzy Mff a Drp1. Funkcja ta może polegać na kierowaniu odpowiedzi na proces fragmentacji w stronę ścieżek biochemicznych będących odpowiedzią na stres w komórce. W związku z tym Fis1 może odgrywać swoją rolę w momencie, w którym produkty fragmentacji mitochondriów są kierowane w stronę utrzymania normalnej mitochondrialnej homeostazy, lub do uruchomienia procesów apoptozy bądź mitofagii [63].

#### MID49 I MID51

Białka MiD49 oraz MiD51 w odróżnieniu od Mff i Fis1 występują jedynie na powierzchni mitochondriów (nie są obecne w peroksysomach) [64], gdzie są zakotwiczone za pośrednictwem N-końca [65]. Z powodu braku tych białek na powierzchni peroksysomów przypisuje się im rolę w zapewnieniu specyficzności i selektywności fragmentacji mitochondriów za pośrednictwem Drp1 [64]. Zaproponowano model, w którym MiD49 i MiD51 są w stanie oddziaływać tylko z Drp1 w postaci dimeru [62] oraz rekrutować to białko do mitochondriów niezależnie od białek Fis1 oraz Mff [61,64]. Inne badania sugerują jednak, że działanie białek MiD jest zależne od Mff i że białka te są rekrutowane do miejsc fragmentacji za pośrednictwem Mff. W odróżnieniu od Mff, zgromadzenie się białek MiD w miejscu fragmentacji mitochondriów wymaga obecności Drp1 [66]. Jednak wyciszenie ekspresji genów kodujących białka MiD49/51 powo-

duje zmniejszenie oddziaływania Drp1 z mitochondrium i elongację tego organellum [65]. Mogłoby to wskazywać na występowanie mechanizmu, w którym MiD wiążą się w miejscu oddziaływania Drp1 z mitochondriami, co powoduje wzrost rekrutacji Drp1 w tej lokalizacji. Nadekspresja genów kodujących białka MiD prowadzi do zwiększonego nagromadzenia Drp1 na powierzchni mitochondriów, jednak fragmentacja jest zahamowana, co objawia się występowaniem wydłużonych mitochondriów. Oznaczać to może, że Drp1 zrekrutowane do mitochondriów jest w tym wypadku nieaktywne [61,64]. Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że nadekspresja genów kodujących MiD49/51 prowadzi do akumulacji na mitochondriach Drp1 w formie fosforylowanej reszty seryny 637, która jest niezdolna do fragmentacji mitochondriów. W warunkach *in vitro* białka MiD dużo silniej oddziałują z Drp1 w formie fosforylowanej (reszta seryny 637), niż z białkiem niefosforylowanym [61]. Potwierdza to więc, że białka MiD rekrutują Drp1 w formie nieaktywnych struktur, które mogą brać udział w procesie fragmentacji mitochondrium dopiero po aktywacji na skutek działania dodatkowego bodźca aktywującego to białko [62]. Na podstawie tych obserwacji zaproponowano, że poziomy białek MiD podlegają w komórkach precyzyjnej regulacji, która ma na celu kontrolę występowania fragmentacji mitochondriów [64].

## KARDIOLIPINA

Innym ważnym czynnikiem prawidłowego przebiegu fragmentacji mitochondrium jest skład lipidowy błon mitochondrialnych, którego istotnym elementem jest kardioplipina. Kardioplipina jest fosfolipidem specyficznym dla mitochondriów, który stanowi 12-17% wszystkich mitochondrialnych fosfolipidów, z czego w większości występuje w wewnętrznej błonie mitochondrialnej (14-23%), a w zewnętrznej błonie stanowi od 3 do 10% lipidów tam występujących [7]. W zewnętrznej błonie mitochondrialnej kardioplipina występuje głównie w miejscach kontaktu z błoną wewnętrzną [22,67]. Kardioplipina pośredniczy we fragmentacji mitochondriów poprzez stymulację oligomeryzacji Drp1 oraz aktywności GTPazowej tego białka na powierzchni mitochondrium [22,68]. W celu związania się Drp1 do mitochondrium oraz stymulacji jego aktywności GTPazowej, lokalne stężenie kardioplipiny musi przekroczyć pewien próg oraz musi ona występować w fazie płynnej umożliwiającej łatwą reorganizację błon mitochondrialnych, która prowadzi do fragmentacji mitochondrium [68]. Wykazano, że kardioplipina oddziałuje z Drp1 poprzez fragment domeny zmiennej [21,22,67,68]. Zaproponowano, że rolą domeny zmiennej jest indukowanie formowania się platform bogatych w kardioplipinę w błonie mitochondrialnej. Lokalne zwiększenie stężenia kardioplipiny w błonie mitochondrium w obecności Drp1 doprowadza do przejścia fazowego tego lipidu z ułożenia lamelarnego dwuwarstwowego do nie-lamelarnego, odwróconego heksagonalnego (faza  $H_{II}$ ), co w dalszym etapie poprzez reorganizację struktury błon mitochondrialnych prawdopodobnie umożliwia zmniejszenie się średnicy mitochondrium w danym miejscu i ostatecznie prowadzi do fragmentacji. Domena zmienna Drp1 odgrywa także rolę w zależnym od hydrolizy GTP przejściu fazowym kardioplipiny z fazy lamelarniej do fazy  $H_{II}$  [68]. W rejonie tej domeny zidentyfikowano 4 reszty lizyny, które są niezbęd-

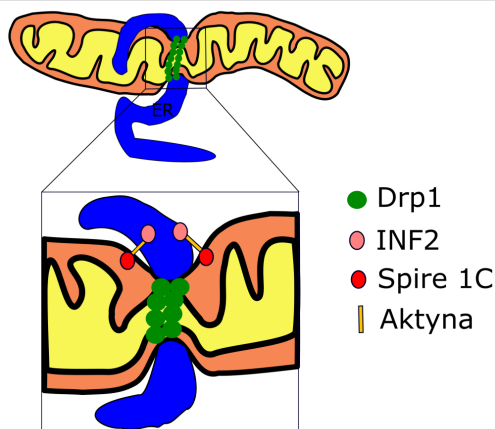
ne w oddziaływaniu Drp1 z kardioplipiną. Wprowadzenie mutacji w tych 4 resztach lizyny prowadzi do zaburzenia oddziaływania Drp1 z kardioplipiną *in vitro* [67], a w komórkach powoduje powstanie wydłużonych mitochondriów, co oznacza, że oddziaływanie Drp1 z kardioplipiną jest niezbędne w prawidłowym przebiegu fragmentacji mitochondriów [68]. Zaobserwowano, że w procesach apoptozy oraz mitofagii, którym towarzyszy fragmentacja mitochondriów, następuje transport kardioplipiny z wewnętrznej błony mitochondrialnej do błony zewnętrznej. Potwierdza to istotną rolę kardioplipiny w procesie rekrutacji Drp1 do mitochondriów [67].

## ROLA SIATECZKI ŚRÓDPLAZMATYCZNEJ I AKTYNY WE FRAGMENTACJI MITOCHONDRIÓW

### SIATECZKA ŚRÓDPLAZMATYCZNA

Siateczka śródplazmatyczna (ER, ang. *endoplasmic reticulum*) pełni w komórce wiele funkcji, do których można zaliczyć między innymi syntezę i modyfikację białek, syntezę lipidów a także magazynowanie oraz uwalnianie jonów wapnia [69]. ER tworzy liczne miejsca kontaktu z pozostałymi organellami w komórce, w tym także z mitochondriami, oraz z błoną komórkową. Miejsca kontaktu pomiędzy ER a mitochondriami biorą udział w sygnalizacji za pośrednictwem jonów wapnia oraz w syntezie fosfolipidów [30,69]. Przykładem współpracy pomiędzy ER a mitochondriami jest synteza kardioplipiny. Kwas fosfatydowy, będący prekursorem kardioplipiny, jest syntetyzowany w ER, a następnie jest transportowany do mitochondriów, gdzie ulega przekształceniu [69]. Miejsca kontaktu ER z mitochondriami są także zaangażowane we fragmentację tego organellum (Ryc. 5) [30]. Analiza miejsc fragmentacji mitochondriów, przeprowadzona w żywych komórkach za pomocą mikroskopii fluorescencyjnej, wykazała, że około 90% tych zdarzeń występowało w miejscu kontaktu ER z mitochondriami. W miejscach, gdzie tubule ER otaczają mitochondria, średnica mitochondriów jest mniejsza niż poza miejscami kontaktu tych organelli, co może wskazywać, że ER bierze udział we wstępnym zaciskaniu błony mitochondrium, co w kolejnym etapie może ułatwiać formowanie się oligomeru Drp1 w tym miejscu [30]. Średnica spiral tworzonych przez Drp1 [28] jest zbliżona do średnicy mitochondrium w miejscu otoczonym przez ER, co wspiera tę hipotezę. W miejscach kontaktu tych dwóch organelli gromadzi się Mff, co pozwala na rekrutację Drp1, a w konsekwencji prowadzi do fragmentacji mitochondrium [30]. W komórkach z wyciszoną ekspresją genów kodujących białka Mff oraz Drp1 również obserwuje się miejsca kontaktu ER z mitochondriami, w których mitochondria mają zmniejszoną średnicę. Oznacza to, że siateczka śródplazmatyczna niezależnie od Mff i Drp1 wyznacza w komórce miejsca, w których może formować się kompleks prowadzący do fragmentacji mitochondrium. ER prawdopodobnie aktywnie uczestniczy we fragmentacji mitochondrium, ponieważ pozostaje związane z tym organellum przez cały okres procesu fragmentacji [30]. Jak dotąd nie poznano mechanizmu, który determinuje lokalizację miejsc kontaktu ER z mitochondriami, a które docelowo są miejscami fragmentacji mitochondriów.





**Rycina 5.** Na rycinie przedstawiono schematyczny rysunek ilustrujący rolę ER i aktyny w procesie fragmentacji mitochondrium. W miejscach kontaktu siateczki śródplazmatycznej oraz mitochondriów dochodzi do polimeryzacji aktyny za pośrednictwem zlokalizowanego w ER białka INF2 oraz mitochondrialnego Spire 1C. Powstałe włókna aktynowe mogą odgrywać rolę w procesie budowy spiralnych struktur tworzonych przez Drp1, jak również w inicjowaniu zmiany konformacyjnej w Drp1 wywołującej ich zaciskanie.

## AKTYNA

W miejscach kontaktu ER z mitochondriami ważną rolę we fragmentacji mitochondriów odgrywa także aktyna (Ryc. 5). Przeprowadzone eksperymenty wykazały, że istotnym elementem kompleksu uczestniczącego we fragmentacji mitochondrium jest zlokalizowane w ER białko INF2 (ang. *inverted formin 2*), które uczestniczy w procesach polimeryzacji i depolimeryzacji aktyny. Wyciszenie ekspresji INF2 w komórkach prowadzi do zmniejszenia puli Drp1 związanej z mitochondriami, a w konsekwencji do elongacji mitochondriów [31]. Oznacza to, że INF2 pośredniczy w procesie oddziaływania Drp1 z mitochondriami, ale na drodze zależnej od aktyny. W miejscach kontaktu ER z mitochondriami białko INF2 jest aktywowane i prowadzi do polimeryzacji aktyny, która zachodzi pomiędzy tymi organelami i jest potrzebna do wstępnego zmniejszenia średnicy mitochondrium oraz może też pośredniczyć w tworzeniu oligomeru Drp1 w miejscu fragmentacji [31]. Odkryto również, że białko Spire1C, występujące w zewnętrznej błonie mitochondrialnej, oddziałuje ze zlokalizowanym w ER INF2. Poprzez oddziaływanie z INF2 Spire1C indukuje tworzenie się filamentów aktynowych, które zacieśniają mitochondria. Podobnie jak w przypadku INF2, wyciszenie ekspresji Spire1C w komórkach prowadzi do elongacji mitochondriów poprzez zahamowanie ich fragmentacji, a nadekspresja tego białka prowadzi do zwiększenia poziomu fragmentacji tego organelum [70].

## PODSUMOWANIE

Przedstawione tutaj informacje pokazują, że fragmentacja sieci mitochondrialnej jest wieloetapowym procesem, angażującym wiele białek oraz organelli, których skoordynowane działanie prowadzi do powstania funkcjonalnego kompleksu. Jednym z głównych składników tego kompleksu fragmentującego jest białko Drp1, które podlega regulacji na wielu poziomach. Białko to występuje w postaci kilku izoform, które mogą tworzyć różniące się rozmiarami struktury oligomeryczne, co pozwala na dopasowanie po-

wstającej struktury spiralnej do rozmiaru mitochondrium. Dodatkowo Drp1 podlega licznym zmianom potranslacyjnym, wpływającym na oddziaływania tego białka z innymi elementami kompleksu fragmentującego. Do istotnych elementów zaangażowanych w proces fragmentacji należą lipid kardiolipina oraz białka Mff, MD49, MiD51, Fis1, będące składnikami zewnętrznej błony mitochondrialnej. Ich dokładna rola pozostaje jeszcze do wyjaśnienia, jednak poprzez różnice w oddziaływaniu z oligomerami Drp1 o różnej funkcjonalności mogą one mieć znaczenie w rekrutowaniu aktywnych oligomerów Drp1 do miejsc fragmentacji, jak również w regulowaniu ich zmian konformacyjnych. Lokalizacja miejsc fragmentacji ma związek z rozkładem mtDNA w sieci mitochondrialnej, jak również jest powiązana z miejscami oddziaływania ER z mitochondriami. Jeden z czynników inicjujących sam proces fragmentacji może stanowić aktyna, której akumulację obserwuje się w miejscach podziału mitochondrium. Poznanie mechanizmów regulacji procesów fragmentacji ma istotne znaczenie dla zrozumienia istoty wielu chorób neurodegeneracyjnych, w których obserwuje się zaburzenia tego procesu. Ilość prac dotyczących regulacji procesu fragmentacji, która ukazała się w ostatnim roku, pokazuje że temat ten jest intensywnie badany i coraz więcej elementów tej skomplikowanej układanki jest odkrywanych.

## PIŚMIENNICTWO

- Friedman JR, Nunnari J (2014) Mitochondrial form and function. *Nature* 505: 335-343
- Westermann B (2010) Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 11: 872-84
- Wojtczak L, Zablocki K (2008) Mitochondria w życiu, chorobie i śmierci komórki. *Postepy Biochem* 54: 129-141
- Detmer SA, Chan DC (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8: 870-879
- Youle RJ, van der Bliek AM, (2012) REVIEW Mitochondrial Fission, Fusion, and Stress. *Science* 337: 1062-1065
- Wilson TJ, Slupe AM, Strack S (2013) Cell signaling and mitochondrial dynamics: Implications for neuronal function and neurodegenerative disease. *Neurobiol Dis* 51: 13-26
- Richter V, Singh AP, Kvensakul M, Ryan MT, Osellame LD (2015) Splitting up the powerhouse: Structural insights into the mechanism of mitochondrial fission. *Cell Mol Life Sci* 72: 3695-3707
- Ugarte-Urbe B, García-Sáez AJ (2014) Membranes in motion: Mitochondrial dynamics and their role in apoptosis. *Biol Chem* 395: 297-311
- Kandimalla R, Hemachandra Reddy P (2015) Multiple Faces of Dynamin-related Protein 1 and Its Role in Alzheimer's Disease Pathogenesis. *Biochim Biophys Acta* 1862: 814-828
- Elgass K, Pakay J, Ryan MT, Palmer CS (2013) Recent advances into the understanding of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 150-161
- Roy M, Reddy PH, Iijima M, Sesaki H (2015) Mitochondrial division and fusion in metabolism. *Curr Opin Cell Biol* 33: 111-118
- Sesaki H, Adachi Y, Kageyama Y, Itoh K, Iijima M (2014) In vivo functions of Drp1: Lessons learned from yeast genetics and mouse knock-outs. *Biochim Biophys Acta - Mol Basis Dis* 1842: 1179-1185
- Ferguson SM (2012) Dynamin, a membrane-remodelling GTPase. *Nat Rev Mol Cell Biol* 13: 75-88
- Schrader M, Costello JL, Godinho LF, Azadi AS, Islinger M (2015) Proliferation and fission of peroxisomes - An update. *Biochim Biophys Acta - Mol Cell Res* 1863: 971-983
- Fröhlich C, Grabiger S, Schwefel D, Faelber K, Rosenbaum E, Mears J, Rocks O, Daumke O (2013) Structural insights into oligomerization

- and mitochondrial remodelling of dynamin 1-like protein. *EMBO J* 32: 1280-1292
16. Mears J a, Lackner LL, Fang S, Ingerman E, Nunnari J, Hinshaw JE (2011) Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol* 18: 20-26
  17. Strack S, Wilson TJ, Cribbs JT (2013) Cyclin-dependent kinases regulate splice-specific targeting of dynamin-related protein 1 to microtubules. *J Cell Biol* 201: 1037-1051
  18. Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12: 2245-2256
  19. Zhu PP, Patterson A, Stadler J, Seeburg DP, Sheng M, Blackstone C (2004) Intra- and intermolecular domain interactions of the C-terminal GTPase effector domain of the multimeric dynamin-like GTPase Drp1. *J Biol Chem* 279: 35967-35974
  20. Koirala S, Guo Q, Kalia R, Bui HT, Eckert DM, Frost A, Shaw JM (2013) Interchangeable adaptors regulate mitochondrial dynamin assembly for membrane scission. *Proc Natl Acad Sci USA* 110: E1342-1351
  21. Ugarte-Urbe B, Müller HM, Otsuki M, Nickel W, García-Sáez AJ (2014) Dynamin-related protein 1 (Drp1) promotes structural intermediates of membrane division. *J Biol Chem* 289: 30645-30656
  22. Macdonald PJ, Stepanyants N, Mehrotra N, Mears JA, Qi X, Sesaki H, Ramachandran R (2014) A dimeric equilibrium intermediate nucleates Drp1 reassembly on mitochondrial membranes for fission. *Mol Biol Cell* 25:1905-1915
  23. Macdonald PJ, Francy CA, Stepanyants N, Lehman L, Baglio A, Mears JA, Qi X, Ramachandran R (2016) Distinct splice variants of dynamin-related protein 1 differentially utilize mitochondrial fission factor as an effector of cooperative GTPase activity. *J Biol Chem* 291:493-507
  24. Ji WK, Hatch AL, Merrill RA, Strack S, Higgs HN (2015) Actin filaments target the oligomeric maturation of the dynamin GTPase Drp1 to mitochondrial fission sites. *Elife* 4: 11553
  25. Francy CA, Alvarez FJD, Zhou L, Ramachandran R, Mears JA (2015) The mechanoenzymatic core of dynamin-related protein 1 comprises the minimal machinery required for membrane constriction. *J Biol Chem* 290: 11692-11703
  26. Strack S, Cribbs JT (2012) Allosteric modulation of Drp1 mechanoenzyme assembly and mitochondrial fission by the variable domain. *J Biol Chem* 287: 10990-11001
  27. Rosenbloom AB, Lee S-H, To M, Lee A, Shin JY, Bustamante C (2014) Optimized two-color super resolution imaging of Drp1 during mitochondrial fission with a slow-switching Dronpa variant. *Proc Natl Acad Sci USA* 111: 13093-13098
  28. Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005) Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170: 1021-1027
  29. Gandre-Babbe S, van der Bliek AM (2008) The Novel Tail-anchored Membrane Protein Mff Controls Mitochondrial and Peroxisomal Fission in Mammalian Cells. *Mol Biol Cell* 19: 2402-2412
  30. Friedman JR, Lackner LL, West M, DiBenedetto JR, Nunnari J, Voeltz GK (2011) ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division. *Science* 334: 358-362
  31. Korobova F, Ramabhadran V, Higgs HN (2013) An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science* 339: 464-467
  32. Clinton RW, Francy CA, Ramachandran R, Qi X, Mears JA (2016) Dynamin-related protein 1 oligomerization in solution impairs functional interactions with membrane-anchored mitochondrial fission factor. *J Biol Chem* 291: 478-492
  33. Otera H, Ishihara N, Mihara K (2013) New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta* 1833: 1256-1268
  34. Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282: 11521-11529
  35. Qi X, Disatnik M-H, Shen N, Sobel RA, Mochly-Rosen D (2011) Aberrant mitochondrial fission in neurons induced by protein kinase C $\delta$  under oxidative stress conditions *in vivo*. *Mol Biol Cell* 22: 256-265
  36. Prieto J, León M, Ponsoda X, Sendra R, Bort R, Ferrer-Lorente R, Raya A, López-García C, Torres J (2016) Early ERK1/2 activation promotes DRP1-dependent mitochondrial fission necessary for cell reprogramming. *Nat Commun* 7: 11124
  37. Chang CR, Blackstone C (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282: 21583-21587
  38. Cribbs JT, Strack S (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8: 939-944
  39. Cereghetti GM, Stangherlin a, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 105:15803-15808
  40. Merrill RA, Dagda RK, Dickey AS, Cribbs JT, Green SH, Usachev YM, Strack S (2011) Mechanism of neuroprotective mitochondrial remodeling by PKA/AKAP1. *PLoS Biol.* 4: e1000612
  41. Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn AC, Takei K, Matsui H, Matsushita M (2008) CaM kinase II-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182: 573-585
  42. Wang W, Wang Y, Long J, Wang J, Haudek SB, Overbeek P, Chang BHJ, Schumacker PT, Danesh FR (2012) Mitochondrial fission triggered by hyperglycemia is mediated by ROCK1 activation in podocytes and endothelial cells. *Cell Metab* 15: 186-200
  43. Wikstrom JD, Israeli T, Bachar-Wikstrom E, Swisa A, Ariav Y, Waiss M, Kaganovich D, Dor Y, Cerasi E, Leibowitz G (2013) AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic  $\beta$ -cells via phosphorylation of DRP1. *Mol Endocrinol* 27: 1706-1723
  44. Chou CH, Lin CC, Yang MC, Wei CC, Liao HD, Lin RC, Tu WY, Kao TC, Hsu CM, Cheng JT, Chou AK, Lee CI, Loh JK, Howng SL, Hong YR (2012) GSK3 $\beta$ -mediated Drp1 phosphorylation induced elongated mitochondrial morphology against oxidative stress. *PLoS One* 7: e49112
  45. Braschi E, Zunino R, McBride HM (2009) MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10: 748-754
  46. Wasiak S, Zunino R, McBride HM (2007) Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177: 439-450
  47. Prudent J, Zunino R, Sugiura A, Mattie S, Shore GC, McBride HM (2015) MAPL SUMOylation of Drp1 Stabilizes an ER/Mitochondrial Platform Required for Cell Death. *Mol Cell* 59: 941-955
  48. Anderson C a., Blackstone C (2013) SUMO wrestling with Drp1 at mitochondria. *EMBO J* 32: 1496-1498
  49. Zunino R, Braschi E, Xu L, McBride HM (2009) Translocation of SenP5 from the nucleoli to the mitochondria modulates DRP1-dependent fission during mitosis. *J Biol Chem* 284: 17783-17795
  50. Guo C, Hildick KL, Luo J, Dearden L, Wilkinson K, Henley JM (2013) SENP3-mediated deSUMOylation of dynamin-related protein 1 promotes cell death following ischaemia. *EMBO J* 32: 1514-1528
  51. Yonashiro R, Ishido S, Kyo S, Fukuda T, Goto E, Matsuki Y, Ohmura-Hoshino M, Sada K, Hotta H, Yamamura H, Inatome R, Yanagi S (2006) A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J* 25: 3618-3626
  52. Nakamura N, Kimura Y, Tokuda M, Honda S, Hirose S (2006) MARCH-V is a novel mitofusin 2- and Drp1-binding protein able to change mitochondrial morphology. *EMBO Rep* 7: 1019-1022
  53. Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178: 71-84
  54. Xu S, Cherok E, Das S, Li S, Roelofs BA, Ge SX, Polster BM, Boyman L, Lederer WJ, Wang C, Karbowski M (2015) Mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 controls mitochondrial fission and cell sensitivity to

- stress-induced apoptosis through regulation of MiD49 protein. *Mol Biol Cell* 27: 349-359
55. Wang H, Song P, Du L, Tian W, Yue W, Liu M, Li D, Wang B, Zhu Y, Cao C, Zhou J, Chen Q (2011) Parkin ubiquitinates Drp1 for proteasome-dependent degradation: Implication of dysregulated mitochondrial dynamics in Parkinson disease. *J Biol Chem* 286: 11649-11658
  56. Cho D-H, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton S (2009) S-Nitrosylation of Drp1 Mediates  $\beta$ -Amyloid: Related Mitochondrial Fission and Neuronal Injury. *Science* 324: 102-105
  57. Bossy B, Petrilli A, Klinglmayr E, Chen J, Lütz-Meindl U, Knott AB, Masliah E, Schwarzenbacher R, Bossy-Wetzel E (2010) S-nitrosylation of DRP1 does not affect enzymatic activity and is not specific to Alzheimer's disease. *J Alzheimer's Dis.* 20: S513-S526
  58. Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto Y, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K (2009) Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11: 958-966
  59. Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M, Sesaki H (2009) The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186: 805-816
  60. Otera H, Wang C, Cleland MM, Setoguchi K, Yokota S, Youle RJ, Mihara K (2010) Mff is an essential factor for mitochondrial recruitment of Drp1 during mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Biol* 191: 1141-1158
  61. Losón OC, Song Z, Chen H, Chan DC (2013) Fis1, Mff, MiD49, and MiD51 mediate Drp1 recruitment in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell* 24: 659667
  62. Liu R, Chan DC (2015) The mitochondrial fission receptor Mff selectively recruits oligomerized Drp1. *Mol Biol Cell* 26: 4466-4477
  63. Shen Q, Yamano K, Head BP, Kawajiri S, Cheung JTM, Wang C, Cho J-H, Hattori N, Youle RJ, van der Bliek AM (2014) Mutations in Fis1 disrupt orderly disposal of defective mitochondria. *Mol Biol Cell* 25: 145-159
  64. Palmer CS, Elgass KD, Parton RG, Osellame LD, Stojanovski D, Ryan MT (2013) Adaptor proteins MiD49 and MiD51 can act independently of Mff and Fis1 in Drp1 recruitment and are specific for mitochondrial fission. *J Biol Chem* 288: 27584-27593
  65. Palmer CS, Osellame LD, Laine D, Koutsopoulos OS, Frazier AE, Ryan MT (2011) MiD49 and MiD51, new components of the mitochondrial fission machinery. *EMBO Rep* 12: 565-573
  66. Elgass KD, Smith E, LeGros M, Larabell C, Ryan MT (2015) Analysis of ER-mitochondria contacts using correlative fluorescence microscopy and soft X-ray tomography of mammalian cells. *J Cell Sci* 128: 2795-2804
  67. Bustillo-Zabalbeitia I, Montessuit S, Raemy E, Basañez G, Terrones O, Martinou JC (2014) Specific interaction with cardiolipin triggers functional activation of dynamin-related protein 1. *PLoS One* 7: e102738
  68. Stepanyants N, Macdonald PJ, Francy CA, Mears JA, Qi X, Ramachandran R (2015) Cardiolipin's propensity for phase transition and its reorganization by dynamin-related protein 1 form a basis for mitochondrial membrane fission. *Mol Biol Cell* 26: 3104-3116
  69. Phillips MJ, Voeltz GK (2015) Structure and function of ER membrane contact sites with other organelles. *Nat Rev Mol Cell Biol* 17: 69-82
  70. Manor U, Bartholomew S, Golani G, Christenson E, Kozlov M, Higgs H, Spudich J, Lippincott-Schwartz J (2015) A mitochondria-anchored isoform of the actin-nucleating spire protein regulates mitochondrial division. *Elife* 4: 08828

## Mechanism of mitochondrial fission – structure and function of Drp1 protein

Bernadeta Michalska, Jerzy Duszyński, Jędrzej Szymański✉

Laboratory of Bioenergetics and Biomembranes, Nencki Institute of Experimental Biology PAS, 3 Pasteur St., 02-093 Warsaw, Poland

✉e-mail: j.szymanski@nencki.gov.pl

**Key words:** Drp1, mitochondrial fission, fission complex

### ABSTRACT

In the cell mitochondria constitute a dynamic network undergoing continuous reshaping by fusion and fission. Mitochondrial fission is involved in several crucial cellular processes such as mitosis, apoptosis and mitophagy. Main mediator of mitochondrial fission is Dynamin related protein 1 (Drp1). This protein is able to assemble into higher order oligomers, what enables the formation of Drp1 spiral structures on the surface of mitochondrial network. These spirals constrict thanks to the energy gained from GTP hydrolysis, what results in mitochondrial fission. Mitochondrial fission process is precisely regulated by different mechanisms, especially by controlling Drp1 activity. This article presents our current understanding of mitochondrial fission with a particular focus on the role of Drp1 in this process and mechanisms that regulate activity of this protein.