

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

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



**Iuliia Efimova**

Biogeneze krist vnitřní mitochondriální membrány  
The inner mitochondrial membrane cristae biogenesis

Bakalářská práce

Vedoucí závěrečné práce/Školitel:  
RNDr. Tomáš Mráček, Ph.D.

Praha, 2016

**Prohlášení:**

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

V Praze, 12.05.2016

Podpis

**Poděkování:**

Chtěla bych na tomto místě poděkovat RNDr. Tomáši Mráčkovi, Ph.D. za vedení mé bakalářské práce, veškeré cenné rady i trpělivost a také za pomoc s jazykovou korekturou.

Děkuji celému kolektivu oddělení bioenergetiky za přátelský přístup a jejich velkou ochotu, s kterou mi radí ohledně různých praktických přístupů v mé experimentální činnosti.

Zvláštní poděkování patří mojí rodině a blízkému okolí za neocenitelnou morální podporu v průběhu celého bakalářského studia.

## **Abstrakt**

Invaginace vnitřní mitochondriální membrány utvářejí kristy - důležitý strukturní a bioenergetický kompartment mitochondrií. Dlouhodobá pozorování ultrastruktury mitochondrií prokázala dynamiku krist, ale nevyjasnila mechanismy jejich formování a stability. Tato práce shrnuje nové poznatky o molekulárních mechanismech biogeneze mitochondriálních krist. Ty jsou konzervovány od hub až po savce, včetně člověka. Důraz je kladen na hlavní remodelační faktory: dimery  $F_1F_0$ -ATP syntázy, MICOS komplex, OPA1 protein a kardiolipin. Jejich defekty vedou k významným změnám nejen na úrovni krist, ale také na úrovni mitochondrií, buněk a celého organismu. S tím souvisejí různé patofyziologické stavy a lidská mitochondriální onemocnění. Detailnější výzkum biogeneze krist je proto velmi významný, nové poznatky by mohly napomoci v rozvoji léčby mitochondriálních poruch.

**Klíčová slova:** mitochondrie, kristy,  $F_1F_0$ -ATP syntáza, MICOS, OPA1, kardiolipin, mitochondriální dysfunkce

## **Abstract**

Invaginations of the inner mitochondrial membrane originate cristae – important structural and bioenergetic mitochondrial compartments. Long-term observations of mitochondrial ultrastructure uncovered cristae dynamics, but did not identify mechanisms of cristae formation and maintenance. This thesis summarizes results of latest research on molecular mechanisms of mitochondrial cristae biogenesis, which are conserved from fungi to mammals including human. The emphasis is put on major remodeling factors:  $F_1F_0$ -ATP synthase dimers, MICOS complex, OPA1 protein and cardiolipin. Their defects lead to extensive changes on cristae level, as well as on mitochondrial, cellular and organismal levels. Various pathophysiological conditions and human mitochondrial diseases are related to these defects. More detailed research of cristae biogenesis is therefore of high significance, new findings could assist in the development of new treatments for mitochondrial disorders.

**Key words:** mitochondria, cristae,  $F_1F_0$ -ATP synthase, MICOS, OPA1, cardiolipin, mitochondrial dysfunction

## Obsah

1. Úvod.....	1
2. Modely vzniku krist.....	3
3. Modelové organismy .....	5
4. Kristy a oxidační fosforylace .....	6
5. Mitochondriální ATP syntáza.....	7
5.1. Dimery $F_1F_0$ -ATP syntáz v mitochondriích.....	8
5.2. Úloha dimerů ATP syntáz ve tvarování krist .....	9
6. Mitochondrial contact site (MICOS) komplex.....	12
6.1. Kristy a MICOS komplex.....	14
7. Proteiny mitochondriálních fúzí a dělení a jejich podíl na formování krist .....	17
7.1. OPA1 v roli architekta krist.....	17
8. Kardiolipin a jeho podíl na stabilitě krist .....	18
9. Patofyziologie krist v mitochondriálních cytopatiích .....	19
9.1. Defekty ATP syntázy a TMEM70.....	20
9.2. ADOA, autozomálně dominantní atrofie zrakového nervu .....	21
9.3. Parkinsonova choroba .....	21
9.4. BTHS, Barthův syndrom.....	22
10. Závěr .....	23
11. Reference.....	24

## Seznam zkratek

ADOA	autosomálně dominantní forma atrofie zrakového nervu (z angl. autosomal dominant optic atrophy)
ATP	adenosintrifosfátová kyselina
ATPAF2	asemblační faktor ATP syntázy 2
BN-PAGE	nativní elektroforéza v polyakrylamidovém gelu (z angl. blue-native polyacrylamide gel electrophoresis)
BTHS	Barthův syndrom (z angl. Barth syndrome)
CJs	z angl. cristae junctions
CL	kardiolipin (z angl. cardiolipin)
CLS	kardiolipin-syntáza (z angl. cardiolipin-synthase)
cyt c	cytochrom c
CoQ <sub>10</sub>	koenzym Q neboli ubichinon (z angl. coenzyme Q <sub>10</sub> (Q), ubiquinone)
Da	Dalton, atomová hmotnostní jednotka definována jako $\frac{1}{12}$ klidové hmotnosti uhlíku <sup>12</sup> C (1 Da = 1.660539040(20)×10 <sup>-27</sup> kg)
DAPIT neboli USMG5	s cukrovkou spjatý protein insulin-senzitivních tkání neboli zvýšená exprese během růstu kosterních svalů (z angl. up-regulated during skeletal muscle growth protein or diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissues)
DNA	deoxyribonukleová kyselina
Drp1	cytosolický dynaminu-podobný protein (z angl. dynamin-1-like protein)
e <sup>-</sup>	elektron
EM	elektronová mikroskopie
F <sub>6</sub>	vazebný faktor mitochondriální ATP syntázy (z angl. mitochondrial ATP synthase-coupling factor)
FADH <sub>2</sub> :FADH <sup>+</sup>	flavin adenin dinukleotid v redukované:oxidované formě
Fzo1	kvasinkový mitofusin
GTPásový protein	protein s GTPásovou aktivitou, tj. schopný vázat a hydrolyzovat guanosintrifosfát (GTP) na guanosindifosfát (GDP) a anorganický fosfát (P <sub>i</sub> )
H <sup>+</sup>	proton

HEK cell line	buněčná linie izolována z lidských embryonálních ledvinných buněk (z angl. human embryonic kidney cells)
HeLa cell line	linie nesmrtelných epiteliálních buněk izolovaných z nádoru (z angl. immortal cell line derived from cervical cancer cells taken from Henrietta Lacks)
ICS	vnitřní prostor krist (z angl. intracristal space)
IF <sub>1</sub>	inhibitor F <sub>1</sub> domény ATP syntázy
IMM, IM	vnitřní mitochondriální membrána (z angl. inner mitochondrial membrane)
IMS	mezimembránový prostor (z angl. intermembrane space)
L-OPA1, S-OPA1	delší a kratší isoformy proteinu OPA1 (z angl. long, short isoforms of OPA1 protein)
MASAP	protein asociovaný s mitochondriální ATP syntázou (z angl. mitochondrial ATP synthase associated protein)
MFN1, MFN2	mitofusin-1, -2; patří k rodině dynamin-příbuzných GTPázových proteinů vnější mitochondriální membrány (z angl. OMM transmembrane GTPase mitofusin-1,-2)
Mgm1	kvasinková mitochondriální dynamin-příbuzná GTPáza
MICOS	mitochondriální komplex pro organizaci krist a kontaktních míst (z angl. mitochondrial contact site and cristae organizing systém)
MINOS	komplex pro organizaci vnitřní mitochondriální membrány (z angl. mitochondrial inner membrane organizing systém)
MitOS	mitochondriální organizační komplex (z angl. mitochondrial organizing structure)
mtDNA	mitochondriální DNA
NADH:NAD <sup>+</sup>	nikotinamid adenin dinukleotid v redukované:oxidované formě
ncDNA	jaderná DNA
OMM, OM	vnější mitochondriální membrána (z angl. outer mitochondrial membrane)
OPA1	dynaminu-podobný 120kDa mitochondriální protein neboli protein atrofie zrakového nervu (z ang. mitochondrial dynamin-like 120 kDa protein or optic atrophy protein 1)
OSCP	protein zodpovědný za citlivost k oligomycinu (z angl. oligomycin sensitivity conferral protein)
OXPHOS	oxidačně-fosforylační systém

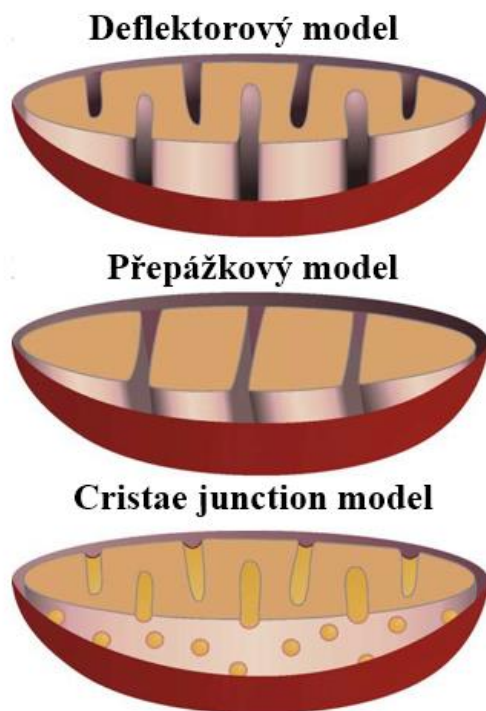
parkin	E3-ubikvitin proteinligáza (z angl. E3 ubiquitin-protein ligase parkin)
PARL	mitochondriální rhomboid-like proteáza asociována s preseniliny (z angl. mitochondrial presenilins-associated rhomboid-like protein)
PD	Parkinsonova choroba (z angl. Parkinson's disease)
PINK1	mitochondriální serin/threoninová proteinkináza (z angl. mitochondrial serin/threonin-protein kinase)
Rbd1p	kvasinková rhomboid-like proteáza ve vnitřní mitochondriální membráně
RCS	superkomplexy respiračního řetězce (z angl. respiratory chain supecomplexes)
RNA	ribonukleová kyselina
ROS	reaktivní formy kyslíku (z angl. reactive oxygen spesies)
SAM	systém skládání a třídění proteinů ve vnější mitochondriální membráně (z angl. sorting and assembly machinery of the outer mitochondrial membrane)
SCs	superkomplexy proteinů OXPHOS řetězce
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu za přítomnosti detergentního prostředku – dodecylsíranu sodného (z angl. sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis)
TAZ	zkratka názvu genu pro protein tafazzin
TIM23	podjednotka translokázy vnitřní mitochondriální membrány (z angl. mitochondrial import inner membrane translocase subunit)
TMEM70	mitochondriální transmembránový protein (z angl. transembrane protein 70, mitochondrial)
TOB complex	komplex topogeneze beta-barelových proteinů vnější mitochondriální membrány (z angl. topogenesis of mitochondrial outer-membrane beta-barrel proteins complex)
TOM	translokáza vnější mitochondriální membrány (z angl. translocase of the outer mitochondrial membrane)
VDAC	napětově závislý aniontový kanál (z angl. voltage-dependent anion channel)
$\Delta$ pH	pH gradient



## 1. Úvod

Každý kompartment a každá buněčná organela v eukaryotické buňce má jednu či více nezbytných funkcí. Mitochondrie nejsou výjimkou: podílejí se hlavně na tvorbě energie ve formě ATP a to způsobem oxidační fosforylace, kdy je směřovaný tok elektronů vnitřní membránou využíván na pumpování protonů a vytvoření protonmotivní síly pohánějící syntézu ATP. Buněčné elektrárny, jak se často mitochondriím říká, byly poprvé popsány v roce 1856. Od této doby se poznatky o mitochondriích značně rozšířily, ale některé záhady přetrvávají doposud (srhnují Cogliati, Enriquez, and Scorrano 2016; van der Giezen 2011; Gray, Burger, and Lang 1999). Dnes je známo, že tyto buněčné organely mají vícekompartmentové složení: vnější a vnitřní membránu, mezimembránový prostor, uvnitř uloženou matrix a kristy s vnitřním prostorem, ohraničeným membránou. Nejčastěji je na mikroskopických snímcích vidět mitochondrie kulatého či oválného tvaru s tubulárními kristami, ale to je jen jedna z mnoha různých morfologických podob, ve kterých se mitochondrie objevují. Diversita ve struktuře a tvaru organel se projevuje jak mezi organismy, tak i mezi tkáněmi a buňkami jednoho organismu (jak je například ukázáno v Deng et al. 1999; Fawcett 1981:443–463; Gunning and Steer 1996:42–43).

Existuje několik modelů popisujících topologií vnitřní mitochondriální membrány (shrnuto v Zick, Rabl, and Reichert 2009). Nejstarším je „Baffle model“ (Deflektorový model), podle kterého se kristy rozmisťují v řadách naproti sobě a jsou široce otevřené do mezimembránového prostoru (Palade 1952, Palade 1953). Jiným modelem je „Septa model“ (Přepážkový model), ve kterém kristy procházejí napříč matrix mitochondrií a dělí ji na menší kompartmenty (Sjostrand 1953). Podle posledního modelu, který je v současné době široce akceptován, místa přechodu membrány krist a vnitřní mitochondriální membrány, „cristae junctions“, se vyznačují úzkým, trubkovitým tvarem (Daems and Wisse 1966). Znázornění všech tří modelů je na obrázku 1.



**Obrázek 1. Modely topologie vnitřní membrány.**

Deflektorový model (Baffle model), Přepážkový model (Septa model), Cristae junction model. Převzato a upraveno podle Zick, Rabl, and Reichert, 2009.

Kristy mají podstatný význam pro stabilitu, architekturu a bioenergetiku mitochondrií. Jednou z jejich nezastupitelných funkcí je například stínění náboje. Na membráně krist jsou lokalizovány komplexy elektron-transportního řetězce, které pumpují protony do IMS (Wilkins, Kohl, and Busch 2013). Přílišná akumulace protonů může lokálně navýšit  $\Delta\text{pH}$  (pH gradient) a ovlivnit náboj těsně podél IMM. Invaginací IMM do matrix a tvorbou krist se zvětšuje její plocha a tím je umožněno lepší rozprostření náboje (Strauss et al. 2008). Zároveň také může docházet k navýšení kvanta membránových proteinů a enzymů. Fyzickým oddělením mezimembránového prostoru, prostoru krist a matrix vznikají odlišné podmínky, které umožňují separaci různých enzymatických procesů a jejich současný průběh. Shrnutí v Cogliati, Enriquez, and Scorrano 2016; Mannella 2008; Zick, Rabl, and Reichert 2009.

Zatímco morfologická ultrastruktura mitochondriálních krist je díky mikroskopii známa již dlouho, molekulární podstata biogeneze krist a faktorů zodpovědných za jejich tvorbu a remodelaci byla donedávna nejasná. Výzkum posledních let přinesl na většinu těchto otázek odpovědi, které shrnuji v této práci.

Cílem práce je rekapitulace existujících poznatků o molekulárních mechanismech zodpovědných za biogenezi krist a o fyziologických projevech způsobených jejich dysfunkcí.

## 2. Modely vzniku krist

Mitochondrie jsou velice dynamické, podléhají strukturním změnám, fúzím a dělením za běžných podmínek. Kromě změny tvaru samotných organel dochází také k neustálému vzniku a zániku krist. Bylo formulováno několik teoretických modelů vzniku krist, většina však postrádá oporu v experimentální práci (Zick, Rabl, and Reichert 2009). Modely jsou shrnuty na obrázku 2.

Jedním z modelů je „Invagination model“ (Invaginační model). Podle něj jsou cristae junctions tvořeny ohyby a vchlípeninami vnitřní mitochondriální membrány. CJs posléze dávají vznik samotným kristám (tento model je založen na teorii spontánního zakřivení membrán podle Helfrich 1972; Renken et al. 2002).

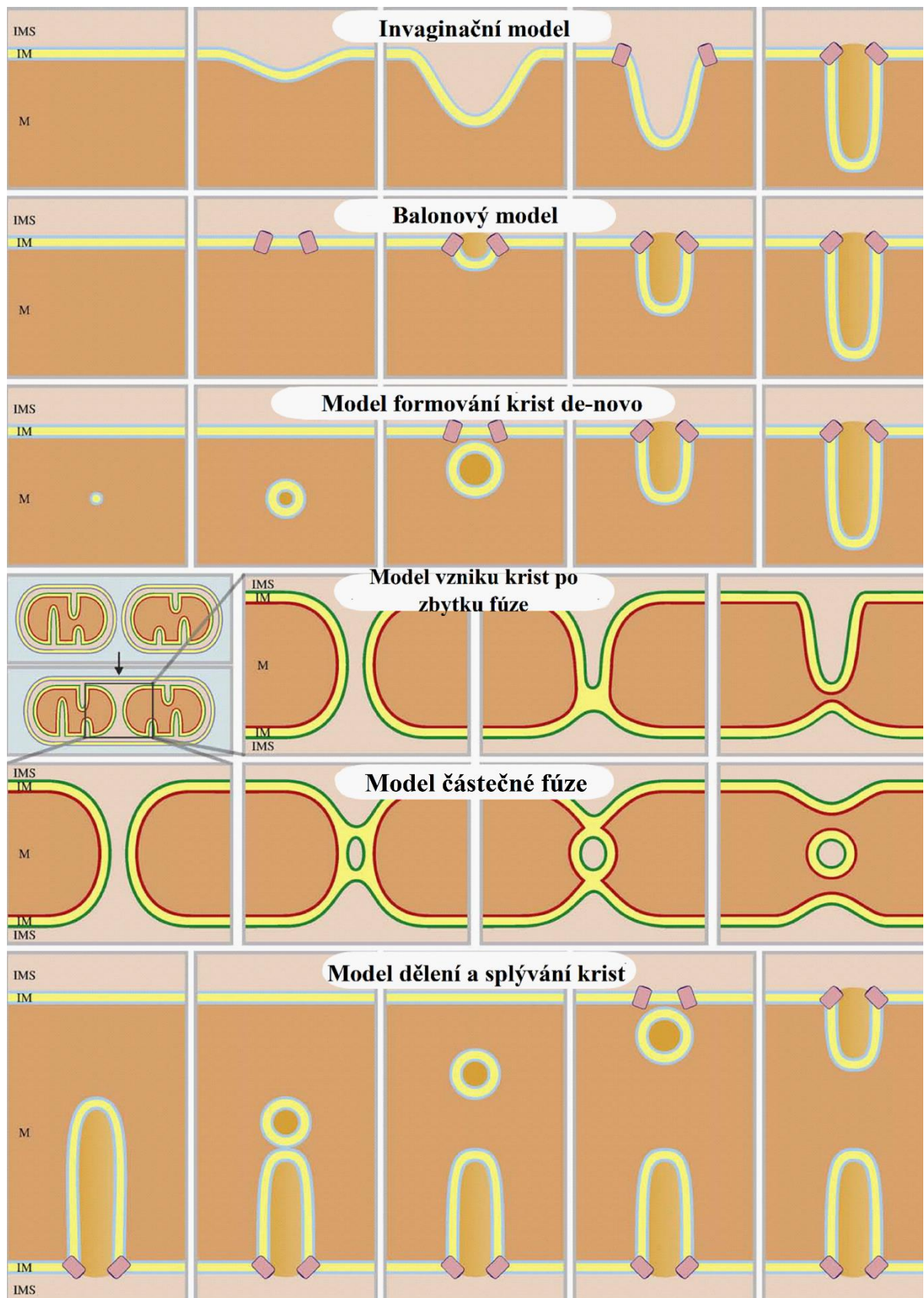
Druhý, podobný předchozímu, je „Balloon model“ (Balonový model), ve kterém CJs vznikají jako stabilní kuličkovité struktury, které umožňují shromáždění lipidů, proteinů a následné ohýbání i invaginaci vnitřní mitochondriální membrány pro budoucí kristy.

Jiným typem je „De-novo vesicle germination model“ (Model formování krist z váčků de-novo). Ten předpokládá vznik váčků uvnitř matrix, které později fúzují s vnitřní mitochondriální membránou; membrána takových váčků se poté mění na membránu krist.

Nově vznikající membrány krist mohou mít původ i z fúzujících mitochondrií. To postuluje „Fusion-remnant model“ (Model vzniku krist po zbytku fúze) a „Hemifusion model“ (Model částečné fúze). První z nich je založen na tom, že kristy pocházejí ze zbytků předchozí fúze a cristae junctions – z oblastí fúze vnitřních membrán mitochondrií. Druhý z výše pojmenovaných modelů se liší od prvního v tom, že při spojení membrán dochází navíc ke vzniku váčků, ze kterých se následně vytvářejí kristy.

Poslední, „Cristae fission-fusion model“ (Model dělení a splývání krist) předpokládá formování vezikul z již existujících mitochondriálních krist, jejich přesun matrix a následující splývání s vnitřní membránou na jiném místě v mitochondrii.

Všechny uvedené modely popisují formování a zachování krist v mitochondriích na základě teoretických znalostí, ale žádný z nich není doposud považován za jediný správný a zcela vysvětlující experimentální data (Zick et al. 2009).



**Obrázek 2. Modely vzniku krist.**

IM – vnitřní membrána, M – matrix, IMS – mezimembránový prostor. Převzato a upraveno podle Zick, Rabl, and Reichert, 2009.

### 3. Modelové organismy

Pro studium mitochondriální morfologie včetně biogeneze krist a dějů s tím souvisejících se používá široké spektrum modelových organismů. Některé (a často neobvyklé) taxonomické skupiny jsou nicméně pro zkoumání konkrétních procesů výhodnější.

Velké množství dat ohledně struktury mitochondrií bylo získáno na kvasinkách, kde byly např. poprvé popsány dimery ATP syntázy (Arnold et al. 1998) i komplexy MICOS (Harner et al. 2011; Hoppins et al. 2011; von der Malsburg et al. 2011; Rabl et al. 2009). Například kvasinka *Saccharomyces cerevisiae* je využívána ve velké většině případů, počínaje zkoumáním struktury  $F_1F_0$ -ATP syntázy (Brunner, Everard-Gigot, and Stuart 2002) a konče výzkumem geneticky podmíněných lidských onemocnění a jejich projevů (Ma et al. 2004). Vedle kvasinek jsou pro výzkum dimerních a oligomerních forem mitochondriálních ATP syntáz využívány i dvě příbuzné řasy, *Chlamydomonas reinhardtii* a *Polytomella* (Arnold et al. 1998; Davies et al. 2012, 2014; Dudkina et al. 2005; van Lis et al. 2003). Výhodou je, že dimery ATP syntáz *C. reinhardtii* a *Polytomella* se od živočišných modelů odlišují svou vysokou stabilitou (Atteia et al. 2003; Dudkina et al. 2005; van Lis et al. 2003; Rexroth et al. 2004).

Vedle hub a rostlinných řas jsou nejčastěji používanými organismy myši a potkani. Jejich tkáně a orgány (srdeční a kosterní svalovina, hnědá tuková tkáň, játra) jsou bohaté na mitochondrie (Cipolat et al. 2006; Civiletto et al. 2015; Darshi et al. 2011; Picard et al. 2015; Varanita et al. 2015). Podobně, byť spíše historicky, jsou využívány hovězí tkáně a to hlavně pro potřeby izolace velkého množství materiálu pro krystalografické studie (Abrahams et al. 1994; Minauro-Sanmiguel, Wilkens, and García 2005; Senior and Brooks 1971; Strauss et al. 2008; Walker et al. 1985).

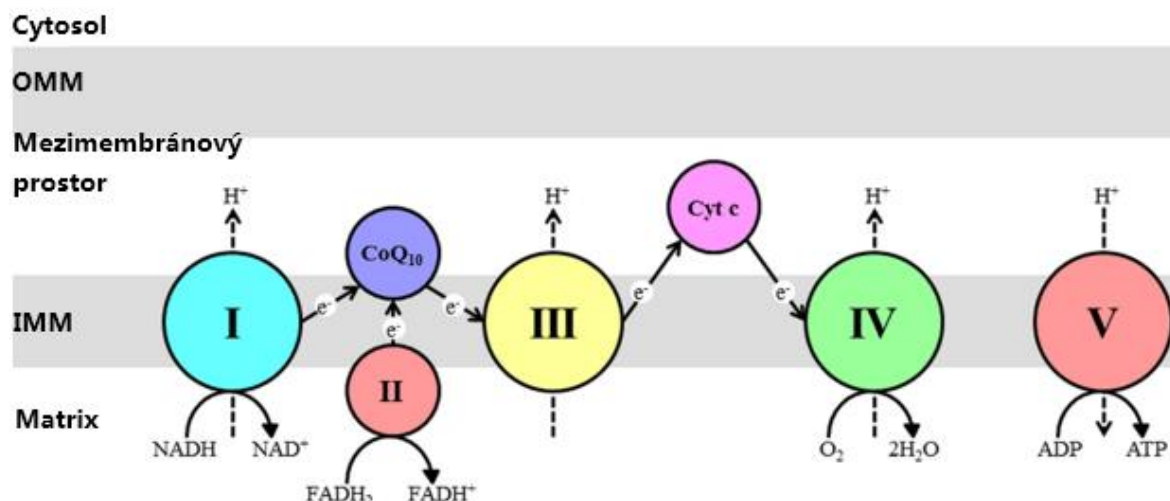
Široce používané v experimentech jsou také buněčné linie vyvinuté z lidských nádorových buněk, například „HeLa“ buňky (Exner et al. 2007; Olichon et al. 2003; Wilkens et al. 2013) nebo lidské buněčné linie embryonálního původu, příkladem jsou „HEK“ buňky (Alkhaja et al. 2012). Velice důležitým nástrojem při zkoumání lidských onemocnění jsou primárně vzorky tkáně a orgánů samotných pacientů odebrané jako biopsie a autopsie

(Acehan et al. 2007; Bissler et al. 2002; Carelli et al. 2015; Gonzalez et al. 2013; Hirai et al. 2001).

Ve snaze zjistit evoluční počátky a vývoj mitochondrií se mnohdy provádějí srovnávací analýzy jak mezi odlišnými taxonomickými skupinami eukaryot, tak i mezi prokaryotními a eukaryotními organismy (Huynen et al. 2016; Muñoz-Gómez et al. 2015).

#### 4. Kristy a oxidační fosforylace

Elektron-transportní řetězec se skládá z pěti komplexů. Komplexy I až IV jsou seřazeny podle rostoucího redoxního potenciálu redoxních párů, od NADH:NAD<sup>+</sup> až po ½O<sub>2</sub>:H<sub>2</sub>O. Transport elektronů je spřažen s pumpováním protonů přes vnitřní membránu mitochondrie do mezimembránového prostoru, čímž se vytváří elektrochemický gradient. Komplex V neboli F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáza následně protonový gradient využívá, translokuje protony zpět do mitochondriální matrix a tím pohání syntézu ATP. Kromě pěti komplexů zakotvených v membráně jsou součástí oxidačně fosforylačního řetězce i mobilní přenašeče elektronů, koenzym Q (ubichinon) a cytochrom c (shrnuto např. v Fernández-Vizarra, Tiranti, and Zeviani 2009).



**Obrázek 3. OXPHOS komplexy na vnitřní mitochondriální membráně.**

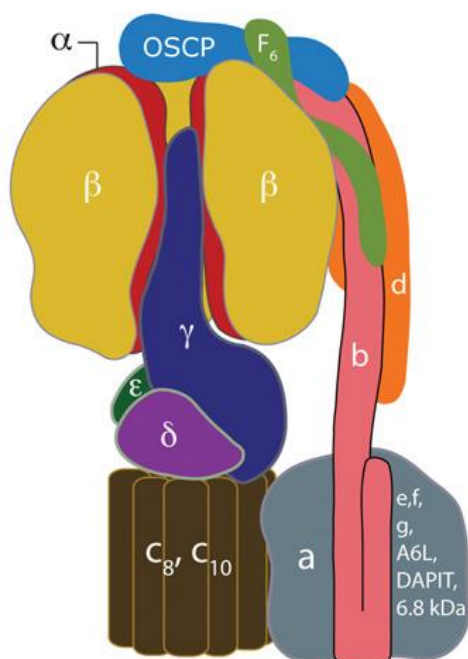
CoQ<sub>10</sub> – ubichinon, Cyt c – cytochrom c, NADH:NAD<sup>+</sup> - nikotinamid adenin dinukleotid v redukované:oxidované formě, FADH<sub>2</sub>:FADH<sup>+</sup> - flavin adenin dinukleotid v redukované:oxidované formě, OMM – vnější mitochondriální membrána, IMM – vnitřní mitochondriální membrána, římskými číslicemi jsou označené jednotlivé komplexy OXPHOS (I – V). Převzato a upraveno podle El-Hattab and Scaglia, 2016.

Komplexy oxidační fosforylace nejsou na vnitřní mitochondriální membráně rozmístěny náhodně. V mnoha pracích byla pozorována jejich distribuce převážně na membráně krist. V jedné z prvních prací při zkoumání remodelace krist a apoptózy bylo zjištěno, že přibližně 85 % zásob cytochromu c se nachází v kristách (Scorrano et al. 2002). Později bylo potvrzeno převládající umístění komplexů III a V na membráně krist (Gilkerson, Selker, and Capaldi 2003). Ukazuje se, že až 94 % procent komplexů ATP syntázy a komplexu III je lokalizováno v membráně krist. Výskyt všech komplexů oxidačně fosforylačního řetězce na mitochondriálních membránách byl také prokázán v jiných pracích (např. Wilkens et al. 2013). Bylo zjištěno, že komplexy jsou na membránách krist velmi zastoupeny, kvantitativně nejnižším byl ale obsah komplexu II.

Aparát oxidační fosforylace se rovněž nějakým způsobem podílí na utváření krist. Bylo například ukázáno, že některé skupiny prvků s mitochondriemi bez oxidačně fosforylačního aparátu, obsahují velmi redukované mitochondrie bez krist (Muñoz-Gómez et al. 2015).

## 5. Mitochondriální ATP syntáza

F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntáza je pátým a posledním enzymatickým komplexem v mitochondriálním respiračním řetězci, jeho přibližná molekulová hmotnost je 600 kDa. Skládá se ze dvou velkých domén: v membráně zakotvené F<sub>o</sub> části a vyčnívající do matrix F<sub>1</sub> části (grafické znázornění je na obrázku 4).



**Obrázek 4. Mitochondriální ATP syntáza.**  
Převzato a upraveno podle John E Walker, 2013.

F<sub>o</sub> část zahrnuje podjednotky a, e, f, g, A6L, DAPIT, 8 kDa proteolipid a c-kruh. S translokací H<sup>+</sup> do matrix je spojena rotace c-kruhu (počet jeho podjednotek se liší mezi různými organismy). F<sub>1</sub> a F<sub>o</sub> části jsou dohromady spojeny dvěma stonky: periferním (podjednotky OSCP, b, d, F<sub>6</sub>) a centrálním (podjednotky  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ). F<sub>1</sub> je katalytickou doménou a je sestavená z podjednotek centrálního stonku a podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$  v poměru:  $\alpha_3\beta_3\gamma_1\epsilon_1\delta_1$  (Senior and Brooks 1971; Esch and Allison 1979; J E Walker et al. 1985). Podjednotky  $\alpha$  a  $\beta$  jsou obě schopné vázat hořčičkové kationty a nukleotidy, ale jen  $\beta$ -podjednotky mají katalytickou aktivitu (shrnuje Walker 2013). C-kruh je spolu s centrálním stonkem rotující (c-kruh,  $\gamma$ ,  $\epsilon$ ,  $\delta$ ), označují se dohromady jako rotor; kdežto všechny ostatní podjednotky ( $\alpha$ ,  $\beta$ , a, e, f, g, A6L, DAPIT, 8 kDa proteolipid, OSCP, b, d, F<sub>6</sub>) jsou stabilní, označují se dohromady jako stator (shrnuje Walker 2013).

### 5.1. Dimery F<sub>1</sub>F<sub>o</sub>-ATP syntáz v mitochondriích

ATP syntázy na vnitřní mitochondriální membráně existují nejen v monomerních, ale i v dimerních a oligomerních formách. V roce 1998 na kvasinkách byla poprvé experimentálně zjištěna a popsána možná struktura ATP syntázových dimerů (Arnold et al. 1998). Solubilizací detergentem, BN- a následnou 2D SDS-PAGE elektroforézou byly získány 2 typy komplexů: jeden o molekulové hmotnosti 500 kDa (monomerní komplexy V) a druhý – přibližně 1000 kDa (dimerní komplexy V). Dimery obsahovaly navíc podjednotky e, g a k (specifická pro kvasinky). Bylo prokázáno, že se dimerní formy ATP syntáz neliší ve specifické enzymatické aktivitě od monomerních forem a že se tři popsané podjednotky nepodílí na syntéze ATP. Podobné výsledky se objevovaly i v jiných pracích (např. v Brunner, Everard-Gigot, and Stuart 2002), i když složení podjednotek zodpovědných za asociaci monomerů ATP syntáz nebylo vždy uniformní (např. ve Fronzes et al. 2006).

Dudkina et al. 2005 pomocí elektronové mikroskopie a „single particle analysis“ zjistila u řasy *Polytomella*, že dva monomery ATP syntázy mezi sebou svírají úhel v 70°, a že monomery spolu interagují v F<sub>o</sub> částech a za pomoci periferních stonků. U blízce příbuzné fotosyntetizující řasy *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondriální dimery ATP syntáz vykazují



vysokou stabilitu; předpokládá se, že dimery obsahují navíc 60 kDa protein MASAP (van Lis et al. 2003) podílející se na jejich stabilitě.

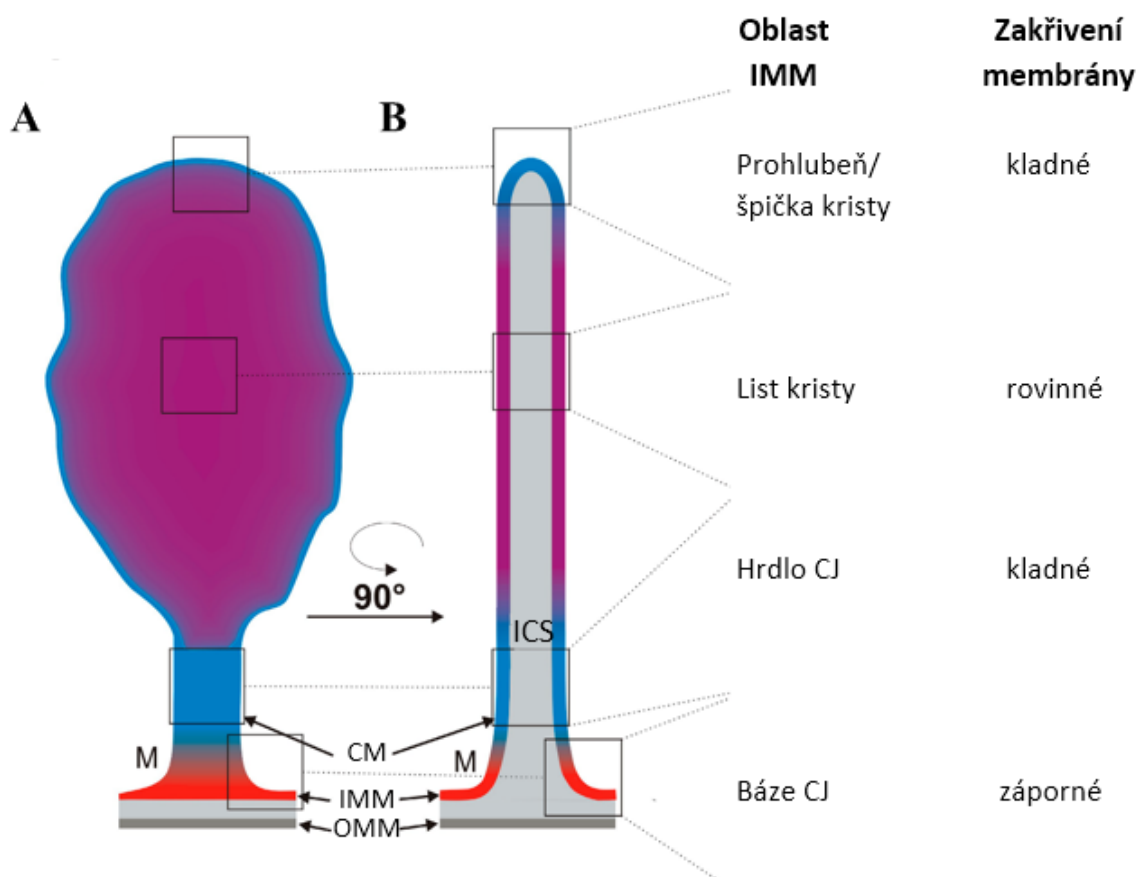
V savčích modelech se vyskytuje značná variabilita v úhlech, od 40° až po 95° (Minauro-Sanmiguel, Wilkens, and García 2005, Strauss et al. 2008, Baker et al. 2012). Strauss et al. 2008 navíc zjistili, že dimerní ATP syntázy jsou na membránách krist umístěné ve dvou řadách paralelně za sebou v místech silného ohybu krist, čímž vytvářejí „stuhly“.

## 5.2. Úloha dimerů ATP syntáz ve tvarování krist

Již více než 10 let se v mnohých pracích objevují důkazy o souvislosti mezi ATP syntázovými dimery a formováním krist (Paumard et al. 2002, Dudkina et al. 2005, Strauss et al. 2008, Davies et al. 2012, aj.). ATP syntáza a její di- a oligomerní formy jsou na membránách krist přítomné ve velkém množství (jedno z prvních pozorování, byť tehdy ještě bez označení oligomerů ATP syntáz, učinil již Parsons 1963), jsou bohatě zastoupené v kladných (prohlubně krist) zakřiveních IMM (schematické znázornění topologie krist a CJs je na obrázku 5) (Rabl et al. 2009; Strauss et al. 2008). Naopak Wilkens et al. 2013 prokázali přítomnost monomerních forem ATP syntázy i v místech záporného zakřivení IMM jakožto cristae junctions (viz obrázek 5). Ke zjištění, jak přesně dimery ovlivňují morfologii vnitřní mitochondriální membrány, jsou často navozeny stavy, ve kterých některé podjednotky ATP syntázy nejsou funkční, důsledky jsou následně analyzovány.

V roce 2002 byla prokázána souvislost mezi ATP syntázou a morfologií vnitřní mitochondriální membrány u kvasinek (Paumard et al. 2002). Inaktivací genů pro podjednotky e a g došlo k fenotypovým změnám: mitochondrie měly tvar „cibule“ nebo byly kruhově uzavřené kolem jiných buněčných organel. Obdobné struktury byly pozorovány i při inaktivaci genu pro podjednotku 4 (ekvivalent savčí podjednotky b). U těchto mutovaných kvasinek nebyla elektroforetickou analýzou prokázána ani přítomnost dimerních a oligomerních forem (potvrzeno i v Brunner, Everard-Gigot, and Stuart 2002). Naproti tomu kontrolní buňky měly jak dimerní a oligomerní formy ATP syntáz, tak i standardní mitochondrie s kristami. Bylo to jedním z důkazů účasti dimerů ATP syntáz v remodelaci krist. Pozdější studie umožnily detailnější pohled na organizaci ATP syntázových dimerů

v kvasinkových mitochondriích (např. za pomoci elektronové kryptografie a molekulárních simulací, Davies et al. 2012, 2014, znázornění je na obrázku 6).



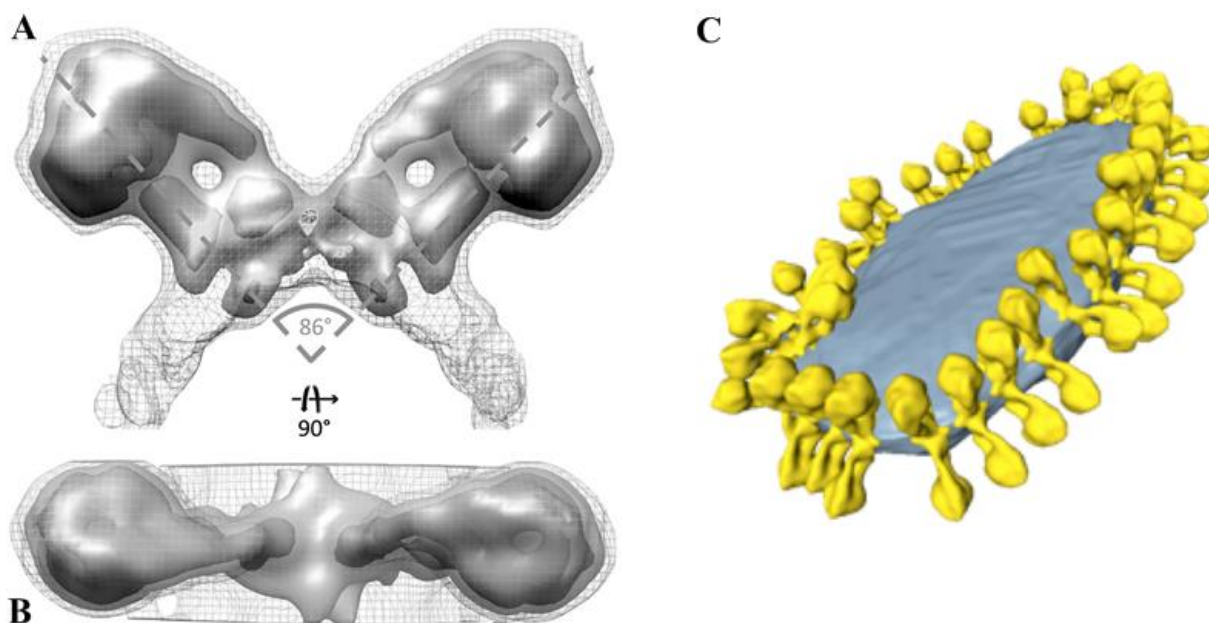
**Obrázek 5. Topologie mitochondriálních krist a cristae junctions.**

(A) Boční pohled na kristu, (B) o 90° otočený pohled na průřez kristy. M – matrix, IMM – vnitřní mitochondriální membrána, OMM – vnější mitochondriální membrána, CM – membrána kristy, ICS – prostor uvnitř kristy. Převzato a upraveno podle Rabl et al., 2009.

Závislost mezi formováním krist a ATP syntázovými mono-, di- a oligomery je studována i na savčích modelech (včetně např. lidských fibroblastů a buněčných linií, např. HeLa buněk) a mimo jiné i v souvislosti s patofyziologiemi (viz kapitola 9).

Zatímco existence dimerních forem ATP syntázy je u savců prokázána, zatím nevyřešenou otázkou je mechanismus jejich vzniku. Předpokládá se, že podjednotky e a g se u savců rovněž podílejí na vzniku dimerů. Inaktivací těchto podjednotek u HeLa buněk se ukázaly abnormální strukturní změny v mitochondriích (Habersetzer et al. 2013). Svou morfologií se ale odlišovaly od kvasinkových mitochondrií s obdobným defektem. Poškozené mitochondrie byly více protáhlé a jejich vnitřní mitochondriální membrána měla

tvar „oblouku“; byla potvrzena i fragmentace mitochondriálních sítí v buňkách. Také bylo prokázáno, že inaktivace obou podjednotek vede k destabilizaci di- a oligomerů ATP syntáz. Největší odlišností od kvasinkových mutantů byla ale skutečnost, že se u mitochondrií snížila aktivita oxidačně-fosforylačního řetězce.



**Obrázek 6. Dimerní formy ATP syntázy u *S. cerevisiae*.**

(A, B) Dimer  $F_1F_0$ -ATP syntázy, monomery mezi sebou svírají úhel  $86^\circ$ . (A) Pohled zepředu; (B) pohled shora, vnitřní mitochondriální membrána je v důsledku dimerizace ATP syntáz ohnutá o  $90^\circ$ . (C) Izolována kvasinková mitochondrie, kde dimery ATP syntáz tvoří „stuh“ v místech největšího zakřivení mitochondriální membrány. Převzato a upraveno podle Davies et al. 2012, 2014.

Kromě úlohy podjednotek e a g na formování ATP syntázových dimerů se rovněž diskutuje role  $IF_1$  proteinu (inhibitor  $F_1$  domény ATP syntázy). Existují práce prokazující přítomnost ATP syntázových dimerů, jejichž monomery jsou spojeny  $IF_1$  (a to v poměru 1:1, kde aktivní  $IF_1$ -dimer vytváří „můstek“ spojující dvě molekuly ATP syntázy) (například práce Bason et al. 2014; García et al. 2006; shrnuto v García-Bermúdez and Cuezva 2016). Studie dokazují, že za nepřítomnosti  $IF_1$  je množství dimerních forem ATP syntázy sníženo, s čímž souvisí i následné defekty v morfologii krist (Campanella et al. 2008, 2009; Faccenda et al. 2013). Jsou ale práce, ve kterých není absence  $IF_1$  spojena se změnami v množství ATP syntázových dimerů nebo abnormální strukturou krist (Fujikawa et al. 2012; Tomasetig et al. 2002). Otevřenou otázkou je i funkce samotného proteinu: primárně inhibice hydrolytické

aktivity  $F_1F_0$ -ATP syntázy se totiž projevuje i na syntázové aktivitě (jak je podrobněji shrnuto v García-Bermúdez and Cuezva 2016).

Přestože molekulární podstata tvorby ATP syntázových dimerů u savců není zatím zcela jasná, studie naznačují, že proces organizace di- a oligomerních forem u savčích buněk je odlišný od kvasinkových modelů.

## **6. Mitochondrial contact site (MICOS) komplex**

Druhou významnou složkou podílející se na strukturování vnitřní mitochondriální membrány je proteinový komplex MICOS. Komplex byl charakterizován nezávisle a téměř současně několika skupinami, což vedlo ke vzniku sady nomenklatur jak pro název samotného komplexu: Mitofilin komplex, MitOS, MINOS, MICOS – tak i pro názvy jeho jednotlivých komponent. Na základě dohody několika vědeckých týmů bylo zavedeno jednotné názvosloví komplexu a jeho komponent (Pfanner et al. 2014), které budu dodržovat ve své práci i já (základní a alternativní terminologie je uvedena v tabulce 1).

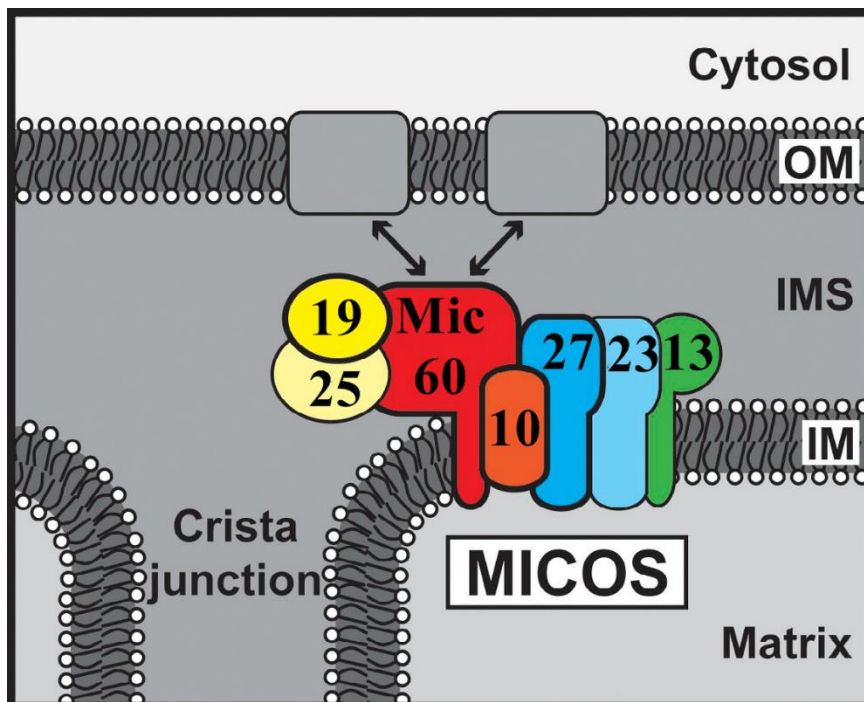
MICOS je velkým multipodjednotkovým komplexem o molekulové hmotnosti cca 1 MDa (uvádí se hodnota  $\approx 700$  kDa, Guarani et al. 2015; Huynen et al. 2016). Podle současných poznatků savčí komplex obsahuje 7 podjednotek: Mic60, Mic10, Mic12, Mic13, Mic19, Mic25, Mic23 a Mic27. Komplex MICOS je konzervován mezi organismy od hub po savce, což dokládá jeho mezidruhovou funkční podobnost ve formování a remodelaci vnitřní mitochondriální membrány a krist (shrnují Huynen et al. 2016; Zerbes et al. 2012). Mic60, Mic10, Mic27, Mic23, Mic13 jsou integrálními proteiny vnitřní mitochondriální membrány, zatímco Mic19 a Mic25 jsou periferními proteiny (Alkhaja et al. 2012; An et al. 2012; Guarani et al. 2015; Hoppins et al. 2011; Huynen et al. 2016; von der Malsburg et al. 2011; Rabl et al. 2009).

**Tabulka 1. Nomenklatura komponent MICOS komplexu.**

Informace pochází z přehledných prací Huynen et al., 2016; Muñoz-Gómez et al., 2015; Pfanner et al., 2014; Zerbes et al., 2012.

<b>Kvasinky</b>	<b>Vyšší eukaryota</b>	<b>Alternativní názvy</b>
Mic60	Mic60	Fcj1, Mitofilin, MINOS2, IMMT a další
Mic10	Mic10	Mcs10, Mio10, MINOS1 a další
Mic12	Mic13 (QIL1 u člověka)	Aim5, Mcs12 a další
Mic27	Mic27 (savčí ortolog kvasinkového Mic27)	Mcs27, Aim37, APOOL, MOMA-1
Mic26	Mic23 (savčí paralog kvasinkového Mic26)	Mio27, Mcs29, Mos2, APOO
Mic19	Mic19	Aim13, Mcs19, CHCH-3, CHCHD3 a další
	Mic25 (lidský ortolog kvasinkového Mic19)	CHCHD6, CHCM1

Proteiny v komplexu mají stabilní uspořádání (jak je schematicky naznačeno na obrázku 7) a navzájem se ovlivňují (Harner et al. 2011; Head et al. 2011; Hoppins et al. 2011). Ukázalo se, že Mic60 a Mic10 jsou základními složkami komplexu (Huynen et al. 2016). Při jejich absenci je MICOS komplex značně redukován co do složení ostatních podjednotek a mitochondriální morfologie je značně narušena (Harner et al. 2011; Hoppins et al. 2011; Huynen et al. 2016; von der Malsburg et al. 2011; Ott et al. 2015). Zmíněné podjednotky mohou tvořit stabilní komplexy nezávisle na MICOS, ale ke stabilitě takových komplexů je potřeba podjednotky Mic19 (Friedman et al. 2015; Huynen et al. 2016). U kvasinek bylo navíc prokázáno, že komponenty Mic10, Mic12, Mic27 mohou také samostatně vytvářet stabilní komplexy nezávislé na ostatních podjednotkách MICOS (Friedman et al. 2015).



Obrázek 7. Model MICOS komplexu.

OM – vnější membrána, IMS – mezimembránový prostor, IM – vnitřní membrána. Šipky ukazují na „contact sites“ – „místa kontaktu“ proteinů na vnější a vnitřní mitochondriální membráně důležité především pro transport proteinů do/z mitochondrie. Převzato a upraveno podle Pfanner et al., 2014.

### 5.3. Kristy a MICOS komplex

Vliv MICOS komplexu jako celku na strukturu mitochondriálních membrán byl prokázán v letech 2011-2012 (Alkhaja et al. 2012; Harner et al. 2011; Hoppins et al. 2011; von der Malsburg et al. 2011), předtím se většinou zkoumaly podjednotky buď jednotlivě, nebo v interakcích jen s některými součástmi komplexu, důvodem pravděpodobně je, že data o celkovém složení MICOS jsou relativně nová.

Jednotlivé komponenty MICOS komplexu přispívají k funkční a strukturní stabilitě mitochondrií v odlišné míře. Jak dokládají studie, základní podjednotky Mic60, Mic10 a Mic19 ovlivňují strukturu i funkci mitochondrií nejvíce. Za jejich nepřítomností se zvyšuje produkce ROS, vnitřní mitochondriální membrána vytváří koncentricky uzavřené formace a CJs většinou chybí (Alkhaja et al. 2012; Darshi et al. 2011; John et al. 2005; Rabl et al. 2009). Jiná situace nastává například při absenci podjednotek Mic23 nebo Mic27, kdy změny ve funkci mitochondrií jsou malé nebo nejsou vůbec pozorovatelné (Head et al. 2011; von der Malsburg et al. 2011). Bylo také ukázáno, že při ztrátě všech komponent MICOS komplexu najednou

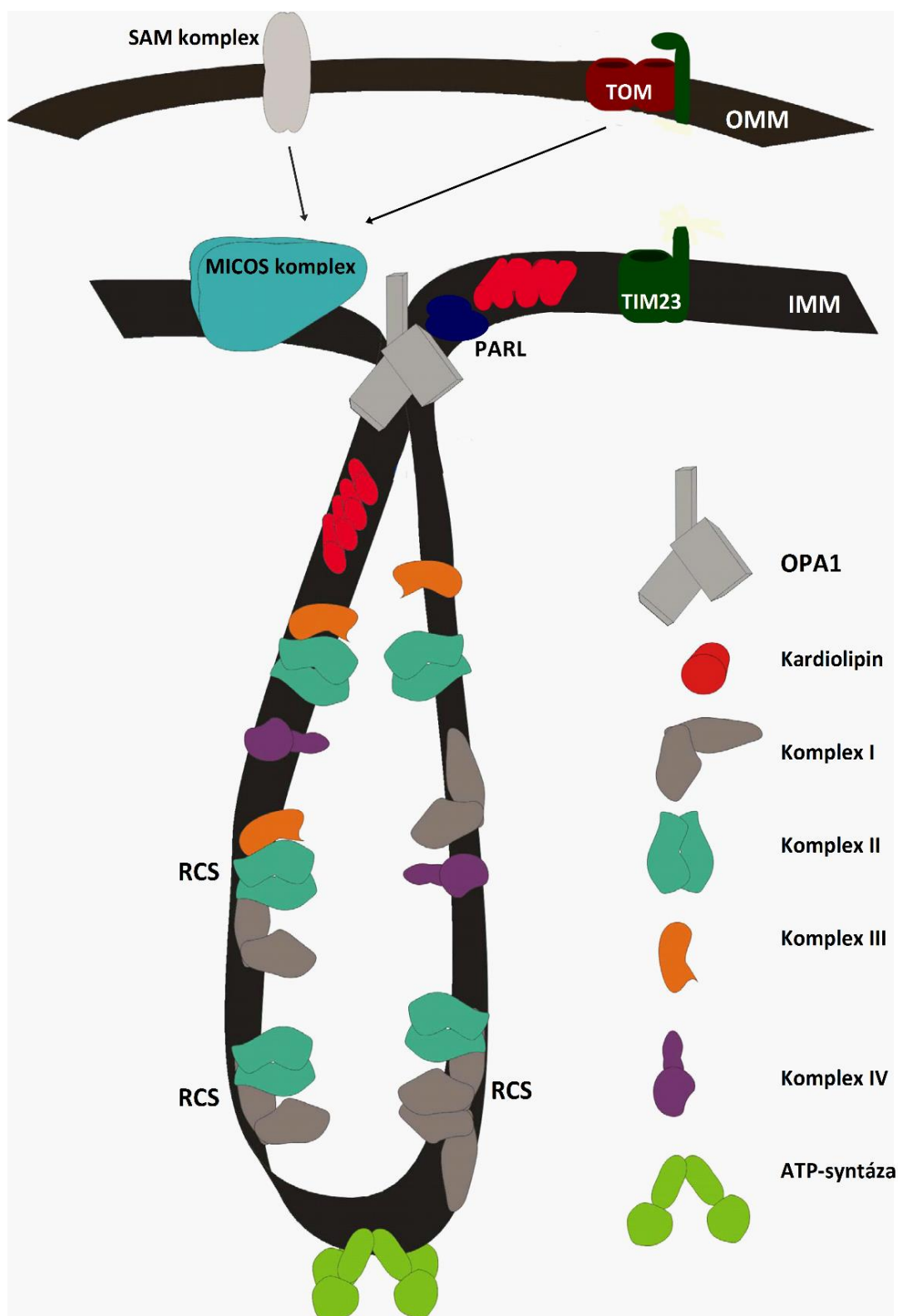
dochází k drastickým změnám jak na úrovni mitochondrií, tak i na úrovni celého organismu (Friedman et al. 2015).

Na základě zjištěných poznatků o MICOS komplexu byl vytvořen model, podle kterého je tento komplex preferenčně lokalizován do míst záporného vinutí vnitřní mitochondriální membrány (tedy báze CJs - viz obrázek 5), a „contact sites“ (kontaktní místa), kde přímo dochází ke kontaktům vnější a vnitřní mitochondriální membrány (schematické znázornění je na obrázku 8).

Interakcí MICOS s OXPHOS komplexy i kardiolipinem (viz také kapitola 8) a antagonistickou funkcí Mic60 a dimerů ATP syntáz tak dochází ke kontrolované remodelaci krist (Rabl et al. 2009).

O MICOS komplexu se uvažuje jako o velmi významném faktoru přímo ovlivňujícím formování a architekturu krist a také strukturu i průměr cristae junctions (viz obrázek 8).

Kromě účasti komplexu na formování krist a CJs jsou předpokládány i další funkce MICOS komplexu v mitochondriích. MICOS může mimo jiné ovlivňovat růst buněk (Hoppins et al. 2011). Jeho interakce s mitochondriálními proteiny vnitřní a vnější membrány ovlivňuje transport proteinů do mitochondrií (Darshi et al. 2011; Hoppins et al. 2011; Huynen et al. 2016; von der Malsburg et al. 2011; Ott et al. 2015). MICOS se také nachází ve fyzické blízkosti proteinů zajišťujících fúzi a dělení mitochondrií. Interakce těchto proteinů (např. MICOS a OPA1, Darshi et al. 2011), může vést ke vzájemné účasti obou jak v remodelaci krist, tak i v mitochondriální dynamice.



**Obrázek 8. Podíl MICOS komplexu na formování krist a cristae junctions.**

OMM – vnější mitochondriální membrána, IMM – vnitřní mitochondriální membrána, IMS – mezimembránový prostor, TOM – translokáza ve vnější mitochondriální membráně, TIM23 – podjednotka translokázy vnitřní mitochondriální membrány, SAM – systém skládání a třídění proteinů ve vnější mitochondriální membráně, PARL – mitochondriální rhomboid-like proteáza, OPA1 – dynaminu-podobný 120 kDa mitochondriální protein (viz také kapitola 7.1), RCS – superkomplexy respiračního řetězce. Šipky ukazují na „contact sites“ (kontaktní místa). Převzato a upraveno podle (Cogliati et al. 2013).



## **7. Proteiny mitochondriálních fúzí a dělení a jejich podíl na formování krist**

Mitochondrie jsou dynamické buněčné organely podléhající častým fúzím a dělením. Zatímco fúze jsou důležité pro existenci buněčné mitochondriální sítě, dělení představuje mimo jiné jediný způsob vzniku nových mitochondrií v buňce. Oba procesy jsou pod kontrolou několika skupin proteinů, nejvýznamnější a nejvíce popsané z nich patří do rodiny dynaminu-příbuzných proteinů. Je to GTPázový protein vnitřní mitochondriální membrány, OPA1 (kvasinkovým homologem je Mgm1 p), fúzní proteiny vnější mitochondriální membrány Mitofusin 1 a Mitofusin 2 (MFN1 a - 2; kvasinkovým homologem je Fzo1) a cytosolický dynaminu-podobný protein DRP1, zajišťující mitochondriální dělení. Kromě role těchto proteinů v mitochondriálních fúzích a děleních je potvrzená jejich účast ve formování krist a CJs a v regulaci apoptózy (shrnutí v Kasahara and Scorrano 2014; Pernas and Scorrano 2015). To ukazuje na vzájemnou souvislost mezi mitochondriální dynamikou a remodelací krist. Dále budu pojednávat o proteinu OPA1, jehož přímý vliv na kristy je dobře dokumentován.

### **5.4. OPA1 v roli architekta krist**

mRNA proteinu OPA1 vznikají alternativním sestřihem ze tří různých sestřihových míst příslušného *OPA1* genu v osmi isoformách (Delettre et al. 2001). Po úpravách vznikají dvě formy proteinu: delší L-OPA1 (integrální transmembránová) a kratší S-OPA1 (rozpustná), která je dále zpracována „rhomboid-like“ (kosodélníku podobnou) mitochondriální proteázou PARL (kvasinkovým homologem je Rbd1p), tvořící rozpustnou IMS složku OPA1 (Cipolat et al. 2006). Funkce OPA1 v modulaci mitochondriální fúze a v remodelaci krist je na sobě nezávislá, tvarování krist pod kontrolou OPA1 naopak těsně souvisí s apoptózou (Cipolat et al. 2004, 2006; Frezza et al. 2006).

Při inaktivaci či delecii *OPA1* genu dochází k abnormálním změnám v mitochondriích. Objevuje se fragmentace mitochondriální sítě, deformace krist, které ztrácejí svůj tubulární protáhlý tvar, stávají více nabobtnané a zvětšují svůj vnitřní prostor, rozšiřuje se průměr CJs

a zásoby cytochromu c jsou uvolněny do mezimembránového prostoru. Cytochrom c následně spouští apoptózu, která se u kontrolních buněk s obsahem OPA1 odehrává také, ale nesrovnatelně méně často. Kromě fenotypových a morfologických transformací jsou buňky postiženy v růstu a proliferaci a mají snížený mitochondriální membránový potenciál (Cipolat et al. 2006; Frezza et al. 2006; Griparic et al. 2004; Meeusen et al. 2006; Merkwirth et al. 2008; Olichon et al. 2003).

Naopak při mírně zvýšené expresi genu pro OPA1 se zvyšuje počet krist a zmenšuje se průměr cristae junctions. Zároveň byla prokázána vyšší stabilita komplexů respiračního řetězce (Civiletto et al. 2015; Cogliati et al. 2013; Varanita et al. 2015).

Regulace morfologie krist pod vlivem OPA1 závisí nejen na přítomnosti samotného proteinu, ale také na tvorbě oligomerů, skládajících se z transmembránových forem L-OPA1 a s nimi interagujících solubilních S-OPA1 (Frezza et al. 2006).

## **8. Kardiolipin a jeho podíl na stabilitě krist**

Kardiolipin (CL z angl. „cardiolipin“) je důležitou lipidovou složkou mitochondriálních membrán, patří k difosfatidylglycerol-lipidům a nese záporný náboj. Téměř se nevyskytuje v membránách jiných eukaryotických buněčných kompartmentů včetně samotné cytoplazmatické membrány. Naopak u prokaryot se vyskytuje na plasmatické membráně (shrnují Ren, Phoon, and Schlame 2014).

Vazba proteinů mitochondriálních membrán, hlavně v IMM, s kardiolipinem je realizována vodíkovými H-můstky, hydrofobními a elektrostatickými interakcemi. Tyto asociace jsou významné pro stabilitu a funkce komplexů respiračního řetězce (shrnují Paradies et al. 2014; Ren et al. 2014; Schlame and Ren 2009). Ve vnitřní mitochondriální membráně se objevuje různě modifikovaný CL (shrnuje Ren et al. 2014), kromě toho existuje určité rozložení jednotlivých forem CL mezi tkáně organismu (shrnuje Houtkooper et al. 2009). Modifikaci provádí několik enzymů, jedním z nich je Tafazzin, fosfolipid-lysofosfolipid transacyláza (Xu et al. 2006). Mutace v genu TAZ kódujícím uvedený protein je mimo jiné u člověka hlavní příčinou Barthova syndromu (BTHS, viz také kapitola 9.4).

Ukázalo se, že CL ovlivňuje asociaci proteinových komplexů v IMM. Je tak např. ovlivněno množství a stabilita superkomplexů (SCs) proteinů OXPHOS (např. III<sub>2</sub>/IV<sub>2</sub> nebo III<sub>2</sub>/IV). Za absence nebo nedostatku CL dochází k rozpadu SCs, což vede i ke snížené účinnosti elektron-transportního řetězce, snížené spotřebě kyslíku, vyšší produkci ROS a ke sníženému membránovému potenciálu (Böttlinger et al. 2012; Desmurs et al. 2015; Dudek et al. 2013; Jiang et al. 2000). U rostlin například delece v genu pro CLS (kariolipin-syntázu) vede k absenci CL a následnému snížení množství SCs OXPHOS, zvýšené tvorbě ROS a abnormalitě mitochondrií s redukováným obsahem krist a změnami v jejich struktuře (Pan, Jones, and Hu 2014; Pineau et al. 2013). V zárodečné linii buněk *Caenorhabditis elegans* nepřítomnost CL vyvolává podobné funkční a morfologické změny v mitochondriích (Sakamoto et al. 2012).

CL rovněž ovlivňuje dimerní a oligomerní formy ATP syntázy. V experimentech s *Drosophila melanogaster* s mutací v CLS bylo prokázáno náhodné rozložení různých forem ATP syntáz, zatímco u kontrol byly dimery F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP syntáz uloženy v paralelních řadách za sebou a vytvářely „stuhý“ v místech ohybu membrány krist. Navíc bylo prokázáno celkové snížení životaschopnosti a zkrácení délky života. (Acehan et al. 2011).

Stabilizační funkce kardiolipinu pro superkomplexy OXPHOS, hlavně pro di- a oligomerní formy ATP syntáz, a také prokázaná interakce CL s proteiny „contact sites“ (kontaktních míst) (Ardail et al. 1990; Kim et al. 2004; Rostovtseva et al. 2006; shrnuto v Planas-Iglesias et al. 2015) a s proteiny MICOS komplexu (Friedman et al. 2015; Weber et al. 2013) dokládá významnou úlohu kardiolipinu v remodelaci krist.

## 9. Patofyziologie krist v mitochondriálních cytopatiích

Mitochondriální dysfunkce jsou onemocnění ovlivňující funkci mitochondrií, což se následně projevuje na jednotlivých buňkách, tkáních, orgánech nebo celosystémově na organismu. Mitochondriální cytopatie, jak bývají rovněž označovány, vznikají v důsledku mutací v mtDNA nebo v ncDNA. Prezentace mitochondriálních poruch mimo jiné závisí i na přítomnosti limitního počtu poškozených mitochondrií, „thresholdu“, po překročení kterého teprve dochází k projevu defektu (shrnují El-Hattab and Scaglia 2016).

Projevy mutací často závisí na konkrétní funkci příslušného proteinu. K poruše v bioenergetice mitochondrií dochází v případě nefunkčnosti proteinů oxidačně-fosforylačního řetězce, která může být navíc doprovázena zvýšenou produkcí ROS. Neméně důležitými jsou mutace v genech pro proteiny ovlivňující mitochondriální fúze a dělení, které vedou ke změnám v morfologii mitochondrií. Nejvíce postiženy jsou typicky tkáně a orgány s vysokými energetickými nároky jako např. nervový systém, kosterní a srdeční svalovina, játra a ledviny (shrnutí v El-Hattab and Scaglia 2016; Nunnari and Suomalainen 2012).

V dnešní době je popsáno velké množství mitochondriálních cytopatií, přičemž změny na ultrastruktuře mitochondrií mohou být primární i sekundární, kdy jde spíše o důsledek energetické nedostatečnosti. Následující kapitoly podávají přehled o těch typech defektů, kde je změna morfologie zřejmě primárním vyvolávajícím činitelem.

## **5.5. Defekty ATP syntázy a TMEM70**

Defekty v komplexu V vedou k různě těžkým formám mitochondriálních onemocnění. Jejich příčinou mohou být mutace v mtDNA (podjednotka a i A6L, shrnutí v Hejzlarová et al. 2014; Jonckheere, Smeitink, and Rodenburg 2012), strukturních podjednotkách  $\epsilon$  (Mayr et al. 2010),  $\alpha$  (Jonckheere et al. 2013) a také v genech pro asemblační faktory ATPAF2 (asemblační faktor ATP syntázy 2, De Meirleir et al. 2004) a TMEM70 (mitochondriální transmembránový protein, Cízková et al. 2008). Právě bioptická vyšetření pacientů s mutovaným TMEM70 ukazují na defektní biogenezi komplexu V, nízké zastoupení jeho funkční monomerní formy, snížení hydrolytické i syntázové aktivity (Cízková et al. 2008; Diodato et al. 2015; Torraco et al. 2012). Důsledkem nízkého množství funkčních ATP syntáz je následně absence di- a oligomerních forem enzymu a s tím související dezorganizace IMM. Jak se ukázalo, i redukce jenom jednoho z prvků remodelace krist, jako je ATP syntáza, vede k drastickým změnám v jejich struktuře. Namísto standardních krist jsou přítomné četné koncentrické útvary IMM nebo se objevují nabobtnané mitochondrie se vzácnými kristami (Braczynski et al. 2015; Cameron et al. 2011; Jonckheere et al. 2011), u některých pacientů (Braczynski et al. 2015) byla pozorována také objemná inkluzní tělíska uvnitř mitochondrií. Byly navíc potvrzeny

změny v respirační aktivitě a organizaci ostatních komplexů OXPHOS, které, jak se předpokládá, vznikly sekundárně (Cameron et al. 2011; Diodato et al. 2015; Torraco et al. 2012).

## 5.6. ADOA, autozomálně dominantní atrofie zřakového nervu

Jiný příklad onemocnění narušující mitochondriální morfologii je ADOA, autosomálně dominantní forma atrofie zřakového nervu. Většinou vzniká v důsledku různých mutací *OPA1* genu. Pro mutace, které nevznikají v části proteinu zodpovědné za GTPázovou aktivitu, je navíc charakteristická „haploinsuficience“, neboli nedostatečnost přítomnosti jedné funkční alely pro správnou činnost proteinu a energetické potřeby buňky.

Nejčastějšími projevy mutací *OPA1* na mitochondriální úrovni jsou defekty v respirační aktivitě vedoucí ke snížené účinnosti tvorby ATP, pozměněná morfologie mitochondrií, které tvoří fragmentovanou síť a jsou v některých případech i menší (Amati-Bonneau et al. 2005; Chevrollier et al. 2008; Nochez et al. 2009; Zanna et al. 2008). V některých pracích se ukazuje vliv na stabilitu mtDNA (Amati-Bonneau et al. 2008), zvýšenou odpověď na apoptotické stimuly a vylití cyt c (Olichon et al. 2007). Rovněž se objevuje abnormální struktura mitochondriálních krist (Amati-Bonneau et al. 2008; Spinazzi et al. 2008). Výsledky některých prací si ale navzájem odporují a ne vždy byla prokázána korelace mezi funkčními a strukturálními projevy. Agier et al. 2012 provedli souhrnnou analýzu čtyř mutací *OPA1* u pacientů s ADOA a potvrdili, že změny v morfologii krist jsou přítomny, i když nebyla na fibroblastech z pacientů prokázána vyšší náchylnost k apoptóze. Agier et al. 2012 se navíc domnívají, že strukturální změny na úrovni mitochondrií by mohly být sekundárními následky dysfunkce OXPHOS systému, nezdůvodňují však, jak by dysfunkce *OPA1* mohla primárně vyvolávat poruchy biogeneze OXPHOS.

## 5.7. Parkinsonova choroba

Mutace v *OPA1* genu (Carelli et al. 2015), ale i v jiných, např. *PINK1*, *parkin* (shrnuto v Kalia and Lang 2015), jsou možnými příčinami parkinsonismu a geneticky podmíněných forem Parkinsonové choroby. Parkinsonova choroba neboli PD (zkratka z angl. Parkinson's

Disease) je celosvětově druhým nejčastějším progredujícím neurodegenerativním onemocněním po Alzheimerově chorobě. Charakteristickými rysy jsou degenerace nebo ztráta neuronů v „substantia nigra“ středního mozku a ukládání „Lewyho tělísek“ v neuronech, i když současné poznatky ukazují na obrovskou rozmanitost patofyziologických a klinických projevů PD (shrnutí v Kalia and Lang 2015). Kromě dokladů o změnách v aktivitě respiračního systému mitochondrií, nedostatečné produkci energie, snížení mitochondriálního membránového potenciálu, vyšší náchylnosti k apoptóze a zvýšeného oxidačního poškození v celé buňce jsou i důkazy abnormální morfologie mitochondrií. Většinou se v pracích ukazuje fragmentace mitochondriální sítě, odchylky od typického kulatého/oválného tvaru mitochondrií a také narušení struktury krist a jejich snížený počet v porovnání s kontrolami (Exner et al. 2007; Trimmer et al. 2000, 2004).

### **5.8. BTHS, Barthův syndrom**

Jeden z příkladů mitochondriálních cytopatií, který (stejně jako výše uvedené defekty komplexu V) nepatří k neurodegenerativním onemocněním, je Barthův syndrom. BTHS syndrom je recesivní X-vázaná choroba, pro kterou je charakteristická kardiomyopatie, neutropenie (snížené množství neutrofilů v krvi), 3-methylglutakonová acidurie a jiné příznaky.

Hlavní příčinou nemoci je mutace v genu *TAZ* (funkčně konzervovaný od kvasinek až po savce) pro protein Tafazzin a následná porucha v remodelaci kardiolipinu, hojně zastoupeném v IMM (shrnutí v Saric et al. 2016). To vede ke změně v množství a zastoupení nejen různých forem CL, ale i jiných glycerofosfolipidů, například fosfatidylglycerolu (PG) (Acehan et al. 2011). V této souvislosti jedním z projevů BTHS je patofyziologie mitochondrií, která zahrnuje abnormality krist a jejich membrán prokazujících obrácené zakřivení. Vzorky pacientů ze srdce, jater, kosterní svaloviny a lymfocytů ukazují na defektní mitochondrie. Počet mitochondrií v buňce a jejich objem je vyšší než u kontrolních vzorků. Je prokázána redukce počtu krist, změna jejich tvaru; kristy na obrázcích z EM často vizuálně chybí a vnitřní mitochondriální membrána vytváří koncentrické závitě. Podstata zvětšení samotných organel není přesně známá, ale předpokládá se, že příčinou může být proliferace mitochondrií

nebo osmotické nabobtnání. Práce navíc potvrzují redukované množství superkomplexů OXPHOS, zvýšenou produkci ROS a snížení mitochondriálního membránového potenciálu (Acehan et al. 2007; Bissler et al. 2002; Gonzalez et al. 2013), podobně jako je tomu u předchozích poruch.

## 10. Závěr

Cílem práce bylo shrnout vývoj poznatků o morfologii a struktuře mitochondriálních krist. Jejich přítomnost ovlivňuje efektivitu a rychlost buněčného dýchání a tvorby energie, ale také chrání mitochondrie a buňky před oxidačním poškozením a kristy se mimo jiné podílejí na regulaci apoptózy. Topologie vnitřní mitochondriální membrány a krist je sledována odedávna, ale proces jejich biogeneze zůstával dlouhou dobu neobjasněn. Vzhledem k významné roli krist v buňce je mimořádně důležité znát molekulární podstatu jejich vzniku a remodelace.

V současné době je dobře prozkoumán a prokázán vliv několika faktorů podílejících se na biogenezi krist. Roli hrají následující proteinové komplexy: komplex V (ATP syntáza) a její dí- a oligomerní formy; multipodjednotkový proteinový komplex MICOS na vnitřní mitochondriální membráně a protein OPA1. Neméně podstatná je i role fosfolipidu kardiolipinu. Při nefunkčnosti nebo nepřítomnosti kterékoliv z těchto komponent u různých skupin organismů dochází k drastickým změnám ve struktuře vnitřní membrány mitochondrie a krist. Jako sekundární účinky a implikace následují dysfunkce buněčné respirace a oxidační fosforylace, snížený membránový potenciál, vyšší hodnota oxidačního poškození a snížení životaschopnosti buněk.

Význam krist potvrzují různá lidská mitochondriální onemocnění, jejichž společnou příčinou jsou poruchy uvedených remodelačních faktorů. Defekty ATP syntázy, ADOA, Parkinsonova choroba a BTSH jsou jen některými popsány příklady mitochondriálních onemocnění. Detailnější zkoumání biogeneze krist v souvislosti s jejich patofyziologií je proto účelné pro rozvoj kauzální léčby mitochondriálních poruch.

## 11. Reference

- Abrahams, J. P., A. G. Leslie, R. Lutter, and J. E. Walker. 1994. "Structure at 2.8 Å Resolution of F<sub>1</sub>-ATPase from Bovine Heart Mitochondria." *Nature* 370(6491):621–28.
- Acehan, Devrim et al. 2011. "Cardiolipin Affects the Supramolecular Organization of ATP Synthase in Mitochondria." *Biophysical Journal* 100(9):2184–92.
- Acehan, Devrim, Yang Xu, David L. Stokes, and Michael Schlame. 2007. "Comparison of Lymphoblast Mitochondria from Normal Subjects and Patients with Barth Syndrome Using Electron Microscopic Tomography." *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 87(1):40–48.
- Agier, Virginie et al. 2012. "Defective Mitochondrial Fusion, Altered Respiratory Function, and Distorted Cristae Structure in Skin Fibroblasts with Heterozygous OPA1 Mutations." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1822(10):1570–80.
- Alkhaja, A. K. et al. 2012. "MINOS1 Is a Conserved Component of Mitofilin Complexes and Required for Mitochondrial Function and Cristae Organization." *Molecular Biology of the Cell* 23(2):247–57.
- Amati-Bonneau, Patrizia et al. 2005. "OPA1 R445H Mutation in Optic Atrophy Associated with Sensorineural Deafness." *Annals of Neurology* 58(6):958–63.
- Amati-Bonneau, Patrizia et al. 2008. "OPA1 Mutations Induce Mitochondrial DNA Instability and Optic Atrophy 'Plus' Phenotypes." *Brain* 131(2):338–51.
- An, Jie et al. 2012. "CHCM1/CHCHD6, Novel Mitochondrial Protein Linked to Regulation of Mitofilin and Mitochondrial Cristae Morphology." *The Journal of biological chemistry* 287(10):7411–26.
- Ardail, D. et al. 1990. "Mitochondrial Contact Sites. Lipid Composition and Dynamics." *The Journal of biological chemistry* 265(31):18797–802.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R. A. Stuart, and H. Schägger. 1998. "Yeast Mitochondrial F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>-ATP Synthase Exists as a Dimer: Identification of Three Dimer-Specific Subunits." *The EMBO journal* 17(24):7170–78.
- Atteia, Ariane et al. 2003. "Bifunctional Aldehyde/alcohol Dehydrogenase (ADHE) in Chlorophyte Algal Mitochondria." *Plant molecular biology* 53(1-2):175–88.
- Baker, Lindsay A., Ian N. Watt, Michael J. Runswick, John E. Walker, and John L. Rubinstein. 2012. "Arrangement of Subunits in Intact Mammalian Mitochondrial ATP Synthase Determined by Cryo-EM." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 109(29):11675–80.
- Bason, John V, Martin G. Montgomery, Andrew G. W. Leslie, and John E. Walker. 2014. "Pathway of Binding of the Intrinsically Disordered Mitochondrial Inhibitor Protein to F<sub>1</sub>-ATPase." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 111(31):11305–10.



- Bissler, J. J. et al. 2002. "Infantile Dilated X-Linked Cardiomyopathy, G4.5 Mutations, Altered Lipids, and Ultrastructural Malformations of Mitochondria in Heart, Liver, and Skeletal Muscle." *Lab Invest* 82(3):335–44.
- Böttinger, Lena et al. 2012. "Phosphatidylethanolamine and Cardiolipin Differentially Affect the Stability of Mitochondrial Respiratory Chain Supercomplexes." *Journal of Molecular Biology* 423(5):677–86.
- Braczynski, Anne K. et al. 2015. "ATP Synthase Deficiency due to TMEM70 Mutation Leads to Ultrastructural Mitochondrial Degeneration and Is Amenable to Treatment." *BioMed Research International* 2015(1):1–10.
- Brunner, Susanne, Valerie Everard-Gigot, and Rosemary A. Stuart. 2002. "Su E of the Yeast F1Fo-ATP Synthase Forms Homodimers." *Journal of Biological Chemistry* 277(50):48484–89.
- Cameron, Jessie M. et al. 2011. "Complex V TMEM70 Deficiency Results in Mitochondrial Nucleoid Disorganization." *Mitochondrion* 11(1):191–99.
- Campanella, Michelangelo et al. 2008. "Regulation of Mitochondrial Structure and Function by the F1Fo-ATPase Inhibitor Protein, IF1." *Cell Metabolism* 8(1):13–25.
- Campanella, Michelangelo et al. 2009. "IF1, the Endogenous Regulator of the F1Fo-ATP synthase, Defines Mitochondrial Volume Fraction in HeLa Cells by Regulating Autophagy." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1787(5):393–401.
- Carelli, Valerio et al. 2015. "Syndromic Parkinsonism and Dementia Associated with OPA1 Missense Mutations." *Annals of Neurology* 78(1):21–38.
- Chevrollier, Arnaud et al. 2008. "Hereditary Optic Neuropathies Share a Common Mitochondrial Coupling Defect." *Annals of Neurology* 63(6):794–98.
- Cipolat, S., O. M. de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. "OPA1 Requires Mitofusin 1 to Promote Mitochondrial Fusion." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101(45):15927–32.
- Cipolat, Sara et al. 2006. "Mitochondrial Rhomboid PARL Regulates Cytochrome c Release during Apoptosis via OPA1-Dependent Cristae Remodeling." *Cell* 126(1):163–75.
- Civiletto, Gabriele et al. 2015. "Opa1 Overexpression Ameliorates the Phenotype of Two Mitochondrial Disease Mouse Models." *Cell Metabolism* 21(6):845–54.
- Cízková, Alena et al. 2008. "TMEM70 Mutations Cause Isolated ATP Synthase Deficiency and Neonatal Mitochondrial Encephalomyopathy." *Nature genetics* 40(11):1288–90.
- Cogliati, Sara et al. 2013. "Mitochondrial Cristae Shape Determines Respiratory Chain Supercomplexes Assembly and Respiratory Efficiency." *Cell* 155(1):160–71.
- Cogliati, Sara, Jose A. Enriquez, and Luca Scorrano. 2016. "Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality." *Trends in Biochemical Sciences*.
- Daems, W. T. and E. Wisse. 1966. "Shape and Attachment of the Cristae Mitochondriales in Mouse Hepatic Cell Mitochondria." *Journal of ultrastructure research* 16(1):123–40.

- Darshi, Manjula et al. 2011. "ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function." *The Journal of biological chemistry* 286(4):2918–32.
- Davies, Karen M. et al. 2014. "Visualization of ATP Synthase Dimers in Mitochondria by Electron Cryo-Tomography." *Journal of visualized experiments: JoVE* (91):51228.
- Davies, Karen M., Claudio Anselmi, Ilka Wittig, Jose D. Faraldo-Gomez, and W. Kuhlbrandt. 2012. "Structure of the Yeast F1Fo-ATP Synthase Dimer and Its Role in Shaping the Mitochondrial Cristae." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109(34):13602–7.
- Delettre, Cécile et al. 2001. "Mutation Spectrum and Splicing Variants in the OPA1 Gene." *Human Genetics* 109(6):584–91.
- Deng, Y. et al. 1999. "Cubic Membrane Structure in Amoeba (Chaos Carolinensis) Mitochondria Determined by Electron Microscopic Tomography." *Journal of structural biology* 127(3):231–39.
- Desmurs, Marjorie et al. 2015. "C11orf83, a Mitochondrial Cardiolipin-Binding Protein Involved in bc1 Complex Assembly and Supercomplex Stabilization." *Molecular and cellular biology* 35(7):1139–56.
- Diodato, Daria et al. 2015. "Common and Novel TMEM70 Mutations in a Cohort of Italian Patients with Mitochondrial Encephalomyopathy." *JIMD reports* 15:71–78.
- Dudek, Jan et al. 2013. "Cardiolipin Deficiency Affects Respiratory Chain Function and Organization in an Induced Pluripotent Stem Cell Model of Barth Syndrome." *Stem Cell Research* 11(2):806–19.
- Dudkina, Natalya V., Jesco Heinemeyer, Wilko Keegstra, Egbert J. Boekema, and Hans Peter Braun. 2005. "Structure of Dimeric ATP Synthase from Mitochondria: An Angular Association of Monomers Induces the Strong Curvature of the Inner Membrane." *FEBS Letters* 579(25):5769–72.
- El-Hattab, Ayman W. and Fernando Scaglia. 2016. "Mitochondrial Cytopathies." *Cell Calcium*.
- Esch, F. S. and W. S. Allison. 1979. "On the Subunit Stoichiometry of the F1-ATPase and the Sites in It That React Specifically with P-Fluorosulfonylbenzoyl-5'-adenosine." *Journal of Biological Chemistry* 254(21):10740–46.
- Exner, Nicole et al. 2007. "Loss-of-Function of Human PINK1 Results in Mitochondrial Pathology and Can Be Rescued by Parkin." *The Journal of neuroscience: the official journal of the Society for Neuroscience* 27(45):12413–18.
- Faccenda, D., C. H. Tan, a Seraphim, M. R. Duchon, and M. Campanella. 2013. "IF1 Limits the Apoptotic-Signalling Cascade by Preventing Mitochondrial Remodelling." *Cell death and differentiation* 20(5):686–97.
- Fawcett, Don Wayne. 1981. "Mitochondria." Pp. 410–68 in *The Cell*. Philadelphia: W. B. Saunders.

- Fernández-Vizarra, Erika, Valeria Tiranti, and Massimo Zeviani. 2009. "Assembly of the Oxidative Phosphorylation System in Humans: What We Have Learned by Studying Its Defects." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research* 1793(1):200–211.
- Frezza, Christian et al. 2006. "OPA1 Controls Apoptotic Cristae Remodeling Independently from Mitochondrial Fusion." *Cell* 126(1):177–89.
- Friedman, Jonathan R., Arnaud Mourier, Justin Yamada, J. Michael McCaffery, and Jodi Nunnari. 2015. "MICOS Coordinates with Respiratory Complexes and Lipids to Establish Mitochondrial Inner Membrane Architecture." *eLife* 4.
- Fronzes, Rémi, Théodore Weimann, Jacques Vaillier, Jean Velours, and Daniel Brèthes. 2006. "The Peripheral Stalk Participates in the Yeast ATP Synthase Dimerization Independently of E and G Subunits." *Biochemistry* 45(21):6715–23.
- Fujikawa, Makoto, Hiromi Imamura, Junji Nakamura, and Masasuke Yoshida. 2012. "Assessing Actual Contribution of IF1, Inhibitor of Mitochondrial FoF1, to ATP Homeostasis, Cell Growth, Mitochondrial Morphology, and Cell Viability." *The Journal of biological chemistry* 287(22):18781–87.
- García, José J., Edgar Morales-Ríos, Paulina Cortés-Hernandez, and José S. Rodríguez-Zavala. 2006. "The Inhibitor Protein (IF1) Promotes Dimerization of the Mitochondrial F1F0-ATP Synthase." *Biochemistry* 45(42):12695–703.
- García-Bermúdez, Javier and José M. Cuezva. 2016. "The ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1): A Master Regulator of Energy Metabolism and of Cell Survival." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1.
- van der Giezen, Mark. 2011. "Mitochondria and the Rise of Eukaryotes." *BioScience* 61(8):594–601.
- Gilkerson, Robert W., J. M. L. Selker, and Roderick A. Capaldi. 2003. "The Cristal Membrane of Mitochondria Is the Principal Site of Oxidative Phosphorylation." *FEBS Letters* 546(2-3):355–58.
- Gonzalvez, François et al. 2013. "Barth Syndrome: Cellular Compensation of Mitochondrial Dysfunction and Apoptosis Inhibition due to Changes in Cardiolipin Remodeling Linked to Tafazzin (TAZ) Gene Mutation." *Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease* 1832(8):1194–1206.
- Gray, Michael W., G. Burger, and B. F. Lang. 1999. "Mitochondrial Evolution." *Science (New York, N.Y.)* 283(5407):1476–81.
- Griparic, Lorena, Nicole N. Van Der Wel, Ian J. Orozco, Peter J. Peters, and Alexander M. Van Der Blik. 2004. "Loss of the Intermembrane Space Protein Mgm1/OPA1 Induces Swelling and Localized Constrictions along the Lengths of Mitochondria." *Journal of Biological Chemistry* 279(18):18792–98.
- Guarani, Virginia et al. 2015. "QIL1 Is a Novel Mitochondrial Protein Required for MICOS Complex Stability and Cristae Morphology." *eLife* 4:e06265.

- Gunning, Brian E. S. and Martin W. Steer. 1996. *Plant Cell Biology: Structure and Function*. Jones & Bartlett Learning.
- Habersetzer, Johann et al. 2013. "Human F1F0 ATP Synthase, Mitochondrial Ultrastructure and OXPHOS Impairment: A (Super-)Complex Matter?" *PLoS one* 8(10):e75429.
- Harner, Max et al. 2011. "The Mitochondrial Contact Site Complex, a Determinant of Mitochondrial Architecture." *The EMBO Journal* 30(21):4356–70.
- Head, Brian P., Miren Zulaika, Sergey Ryazantsev, and Alexander M. van der Bliek. 2011. "A Novel Mitochondrial Outer Membrane Protein, MOMA-1, That Affects Cristae Morphology in *Caenorhabditis Elegans*." *Molecular biology of the cell* 22:831–41.
- Hejzlarová, K. et al. 2014. "Nuclear Genetic Defects of Mitochondrial ATP Synthase." *Physiological research / Academia Scientiarum Bohemoslovaca* 63 Suppl 1(1995):S57–71.
- Helfrich, W. 1972. "Elastic Properties of Lipid Bilayers: Theory and Possible Experiments." *Zeitschrift für Naturforschung. Teil C: Biochemie, Biophysik, Biologie, Virologie* 28(11):693–703.
- Hirai, Keisuke et al. 2001. "Mitochondrial Abnormalities in Alzheimer's Disease." *J. Neurosci.* 21(9):3017–23.
- Hoppins, Suzanne et al. 2011. "A Mitochondrial-Focused Genetic Interaction Map Reveals a Scaffold-like Complex Required for Inner Membrane Organization in Mitochondria." *The Journal of cell biology* 195(2):323–40.
- Houtkooper, Riekelt H. et al. 2009. "The Enigmatic Role of Tafazzin in Cardiolipin Metabolism." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(10):2003–14.
- Huynen, Martijn A., Mareike Mühlmeister, Katherina Gotthardt, Sergio Guerrero-Castillo, and Ulrich Brandt. 2016. "Evolution and Structural Organization of the Mitochondrial Contact Site (MICOS) Complex and the Mitochondrial Intermembrane Space Bridging (MIB) Complex." *Biochimica et biophysica acta* 1863(1):91–101.
- Jiang, Feng et al. 2000. "Absence of Cardiolipin in the *crd1* Null Mutant Results in Decreased Mitochondrial Membrane Potential and Reduced Mitochondrial Function." *Journal of Biological Chemistry* 275(29):22387–94.
- John, George B. et al. 2005. "The Mitochondrial Inner Membrane Protein Mitofilin Controls Cristae Morphology." *Molecular biology of the cell* 16(3):1543–54.
- Jonckheere, An I. et al. 2011. "Restoration of Complex V Deficiency Caused by a Novel Deletion in the Human TMEM70 Gene Normalizes Mitochondrial Morphology." *Mitochondrion* 11(6):954–63.
- Jonckheere, An I. et al. 2013. "A Complex v ATP5A1 Defect Causes Fatal Neonatal Mitochondrial Encephalopathy." *Brain* 136(5):1544–54.
- Jonckheere, An I., Jan A. M. Smeitink, and Richard J. T. Rodenburg. 2012. "Mitochondrial ATP Synthase: Architecture, Function and Pathology." *Journal of inherited metabolic disease* 35(2):211–25.

- Kalia, Lorraine V. and Anthony E. Lang. 2015. "Parkinson's Disease." *The Lancet* 386(9996):896–912.
- Kasahara, Atsuko and Luca Scorrano. 2014. "Mitochondria: From Cell Death Executioners to Regulators of Cell Differentiation." *Trends in Cell Biology* 24(12):761–70.
- Kim, Tae-Hyoung et al. 2004. "Bid-Cardiolipin Interaction at Mitochondrial Contact Site Contributes to Mitochondrial Cristae Reorganization and Cytochrome C Release." *Molecular biology of the cell* 15(7):3061–72.
- van Lis, Robert, Ariane Atteia, Guillermo Mendoza-Hernández, and Diego González-Halphen. 2003. "Identification of Novel Mitochondrial Protein Components of *Chlamydomonas Reinhardtii*. A Proteomic Approach." *Plant physiology* 132(1):318–30.
- Ma, Lining, Frederic M. Vaz, Zhiming Gu, Ronald J. A. Wanders, and Miriam L. Greenberg. 2004. "The Human TAZ Gene Complements Mitochondrial Dysfunction in the Yeast *taz1??* Mutant: Implications for Barth Syndrome." *Journal of Biological Chemistry* 279(43):44394–99.
- von der Malsburg, Karina et al. 2011. "Dual Role of Mitofilin in Mitochondrial Membrane Organization and Protein Biogenesis." *Developmental Cell* 21(4):694–707.
- Mannella, Carmen A. 2008. "Structural Diversity of Mitochondria: Functional Implications." *Annals of the New York Academy of Sciences* 1147:171–79.
- Mayr, Johannes A. et al. 2010. "Mitochondrial ATP Synthase Deficiency due to a Mutation in the ATP5E Gene for the F1  $\epsilon$  Subunit." *Human Molecular Genetics* 19(17):3430–39.
- Meeusen, Shelly et al. 2006. "Mitochondrial Inner-Membrane Fusion and Crista Maintenance Requires the Dynamin-Related GTPase Mgm1." *Cell* 127(2):383–95.
- De Meirleir, L. et al. 2004. "Respiratory Chain Complex V Deficiency due to a Mutation in the Assembly Gene ATP12." *Journal of medical genetics* 41(2):120–24.
- Merkwirth, Carsten et al. 2008. "Prohibitins Control Cell Proliferation and Apoptosis by Regulating OPA1-Dependent Cristae Morphogenesis in Mitochondria." *Genes & Development* 22(4):476–88.
- Minauro-Sanmiguel, Fernando, Stephan Wilkens, and José J. García. 2005. "Structure of Dimeric Mitochondrial ATP Synthase: Novel F0 Bridging Features and the Structural Basis of Mitochondrial Cristae Biogenesis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102(35):12356–58.
- Muñoz-Gómez, Sergio A. et al. 2015. "Ancient Homology of the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System Points to an Endosymbiotic Origin of Mitochondrial Cristae." *Current biology: CB* 25(11):1489–95.
- Nochez, Yannick et al. 2009. "Acute and Late-Onset Optic Atrophy due to a Novel OPA1 Mutation Leading to a Mitochondrial Coupling Defect." *Molecular vision* 15(October 2008):598–608.
- Nunnari, Jodi and Anu Suomalainen. 2012. "Mitochondria: In Sickness and in Health." *Cell*

148(6):1145–59.

- Olichon, Aurélien et al. 2003. "Loss of OPA1 Perturbates the Mitochondrial Inner Membrane Structure and Integrity, Leading to Cytochrome c Release and Apoptosis." *Journal of Biological Chemistry* 278(10):7743–46.
- Olichon, Aurélien et al. 2007. "Effects of OPA1 Mutations on Mitochondrial Morphology and Apoptosis: Relevance to ADOA Pathogenesis." *Journal of cellular physiology* 211(2):423–30.
- Ott, Christine, Eva Dorsch, Martin Fraunholz, Sebastian Straub, and Vera Kozjak-Pavlovic. 2015. "Detailed Analysis of the Human Mitochondrial Contact Site Complex Indicate a Hierarchy of Subunits" edited by P. A. Cobine. *PLOS ONE* 10(3):e0120213.
- Palade, G. E. 1953. "AN ELECTRON MICROSCOPE STUDY OF THE MITOCHONDRIAL STRUCTURE." *Journal of Histochemistry & Cytochemistry* 1(4):188–211.
- Palade, George E. 1952. "The Fine Structure of Mitochondria." *The Anatomical Record* 114(3):427–51.
- Pan, Ronghui, a Daniel Jones, and Jianping Hu. 2014. "Cardiolipin-Mediated Mitochondrial Dynamics and Stress Response in Arabidopsis." *The Plant cell* 26(1):391–409.
- Paradies, Giuseppe, Valeria Paradies, Valentina De Benedictis, Francesca M. Ruggiero, and Giuseppe Petrosillo. 2014. "Functional Role of Cardiolipin in Mitochondrial Bioenergetics." *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* 1837(4):408–17.
- Parsons, D. F. 1963. "Mitochondrial Structure: Two Types of Subunits on Negatively Stained Mitochondrial Membranes." *Science (New York, N.Y.)* 140(3570):985–87.
- Paumard, Patrick et al. 2002. "The ATP Synthase Is Involved in Generating Mitochondrial Cristae Morphology." *The EMBO journal* 21(3):221–30.
- Pernas, Lena and Luca Scorrano. 2015. "Mito-Morphosis: Mitochondrial Fusion, Fission, and Cristae Remodeling as Key Mediators of Cellular Function." *Annual review of physiology* 78(1):annurev – physiol – 021115–11.
- Pfanner, N. et al. 2014. "Uniform Nomenclature for the Mitochondrial Contact Site and Cristae Organizing System." *The Journal of Cell Biology* 204(7):1083–86.
- Picard, Martin et al. 2015. "Trans-Mitochondrial Coordination of Cristae at Regulated Membrane Junctions." *Nature Communications* 6:6259.
- Pineau, Bernard et al. 2013. "The Importance of Cardiolipin Synthase for Mitochondrial Ultrastructure, Respiratory Function, Plant Development, and Stress Responses in Arabidopsis." *The Plant cell* 25(October):4195–4208.
- Planas-Iglesias, Joan et al. 2015. "Cardiolipin Interactions with Proteins." *Biophysical Journal* 109(6):1282–94.
- Rabl, Regina et al. 2009. "Formation of Cristae and Crista Junctions in Mitochondria Depends on Antagonism between Fcj1 and Su E/g." *Journal of Cell Biology* 185(6):1047–63.
- Ren, Mindong, Colin K. L. Phoon, and Michael Schlame. 2014. "Metabolism and Function of

- Mitochondrial Cardiolipin." *Progress in Lipid Research* 55(1):1–16.
- Renken, Christian et al. 2002. "A Thermodynamic Model Describing the Nature of the Crista Junction: A Structural Motif in the Mitochondrion." *Journal of Structural Biology* 138(1-2):137–44.
- Rexroth, Sascha et al. 2004. "Dimeric H<sup>+</sup>-ATP Synthase in the Chloroplast of *Chlamydomonas Reinhardtii*." *Biochimica et biophysica acta* 1658(3):202–11.
- Rostovtseva, Tatiana K., Namdar Kazemi, Michael Weinrich, and Sergey M. Bezrukov. 2006. "Voltage Gating of VDAC Is Regulated by Nonlamellar Lipids of Mitochondrial Membranes." *Journal of Biological Chemistry* 281(49):37496–506.
- Sakamoto, Taro et al. 2012. "Deficiency of Cardiolipin Synthase Causes Abnormal Mitochondrial Function and Morphology in Germ Cells of *Caenorhabditis Elegans*." *Journal of Biological Chemistry* 287(7):4590–4601.
- Saric, Ana, Karine Andreau, Anne-Sophie Armand, Ian M. Møller, and Patrice X. Petit. 2016. "Barth Syndrome: From Mitochondrial Dysfunctions Associated with Aberrant Production of Reactive Oxygen Species to Pluripotent Stem Cell Studies." *Frontiers in Genetics* 6(January):1–26.
- Schlame, Michael and Mindong Ren. 2009. "The Role of Cardiolipin in the Structural Organization of Mitochondrial Membranes." *Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes* 1788(10):2080–83.
- Scorrano, Luca et al. 2002. "A Distinct Pathway Remodels Mitochondrial Cristae and Mobilizes Cytochrome c during Apoptosis." *Developmental Cell* 2(1):55–67.
- Senior, A. E. and J. C. Brooks. 1971. "The Subunit Composition of the Mitochondrial Oligomycin-Insensitive ATPase." *FEBS Letters* 17(2):327–29.
- Sjostrand, F. S. 1953. "Electron Microscopy of Mitochondria and Cytoplasmic Double Membranes." *Nature* 171(4340):30–32.
- Spinazzi, Marco et al. 2008. "A Novel Deletion in the GTPase Domain of OPA1 Causes Defects in Mitochondrial Morphology and Distribution, but Not in Function." *Human Molecular Genetics* 17(21):3291–3302.
- Strauss, Mike, Götz Hofhaus, Rasmus R. Schröder, and Werner Kühlbrandt. 2008. "Dimer Ribbons of ATP Synthase Shape the Inner Mitochondrial Membrane." *The EMBO journal* 27(7):1154–60.
- Tomasetig, Lara, Francesca Di Pancrazio, David A. Harris, Irene Mavelli, and Giovanna Lippe. 2002. "Dimerization of F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>ATP Synthase from Bovine Heart Is Independent from the Binding of the Inhibitor Protein IF<sub>1</sub>." *Biochimica et biophysica acta* 1556(2-3):133–41.
- Torraco, Alessandra et al. 2012. "TMEM70: A Mutational Hot Spot in Nuclear ATP Synthase Deficiency with a Pivotal Role in Complex v Biogenesis." *Neurogenetics* 13(4):375–86.
- Trimmer, P. A. et al. 2000. "Abnormal Mitochondrial Morphology in Sporadic Parkinson's and Alzheimer's Disease Cybrid Cell Lines." *Exp Neurol* 162(1):37–50.

- Trimmer, Patricia a, M. Kathleen Borland, Paula M. Keeney, James P. Bennett, and W. Davis Parker. 2004. "Parkinson's Disease Transgenic Mitochondrial Cybrids Generate Lewy Inclusion Bodies." *Journal of neurochemistry* 88(4):800–812.
- Varanita, Tatiana et al. 2015. "The opa1-Dependent Mitochondrial Cristae Remodeling Pathway Controls Atrophic, Apoptotic, and Ischemic Tissue Damage." *Cell metabolism* 21(6):834–44.
- Walker, J. E. et al. 1985. "Primary Structure and Subunit Stoichiometry of F1-ATPase from Bovine Mitochondria." *Journal of molecular biology* 184(4):677–701.
- Walker, John E. 2013. "The ATP Synthase: The Understood, the Uncertain and the Unknown." *Biochemical Society transactions* 41(1):1–16.
- Weber, Tobias A. et al. 2013. "APOOL Is a Cardiolipin-Binding Constituent of the Mitofilin/MINOS Protein Complex Determining Cristae Morphology in Mammalian Mitochondria." *PLoS ONE* 8(5).
- Wilkins, Verena, Wladislaw Kohl, and Karin Busch. 2013. "Restricted Diffusion of OXPHOS Complexes in Dynamic Mitochondria Delays Their Exchange between Cristae and Engenders a Transitory Mosaic Distribution." *Journal of cell science* 126(Pt 1):103–16.
- Xu, Yang, Ashim Malhotra, Mindong Ren, and Michael Schlame. 2006. "The Enzymatic Function of Tafazzin." *Journal of Biological Chemistry* 281(51):39217–24.
- Zanna, Claudia et al. 2008. "OPA1 Mutations Associated with Dominant Optic Atrophy Impair Oxidative Phosphorylation and Mitochondrial Fusion." *Brain* 131(2):352–67.
- Zerbes, Ralf M. et al. 2012. "Mitofilin Complexes: Conserved Organizers of Mitochondrial Membrane Architecture." *Biological Chemistry* 393(11):1247–61.
- Zick, Michael, Regina Rabl, and Andreas S. Reichert. 2009. "Cristae Formation—linking Ultrastructure and Function of Mitochondria." *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1793(1):5–19.