

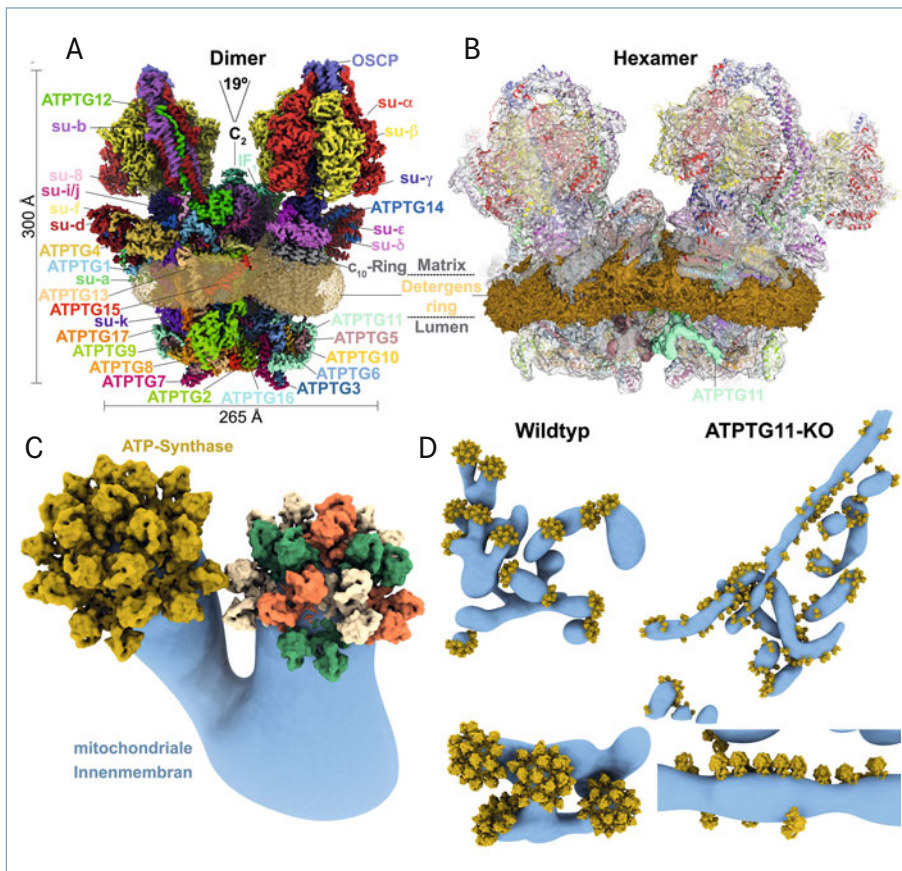
Bioenergetik

Mechanismen der Cristae-Biogenese in Humanparasiten

ALEXANDER MÜHLEIP

DEPARTMENT OF BIOCHEMISTRY AND BIOPHYSICS, STOCKHOLM UNIVERSITY, SCHWEDEN

Mitochondrial energy conversion depends on an intricately folded membrane structure, generated by oligomerisation of ATP synthase dimers. However, morphology of cristae membranes varies greatly between different organisms. Recent studies have revealed the unique ATP synthase assemblies of the causative agents of toxoplasmosis and sleeping sickness, giving insight into the role of parasite-specific subunits in complex assembly, mitochondrial function and parasite fitness.

DOI: 10.1007/s12268-022-1831-5
© Der Autor 2022

▲ **Abb. 1:** ATP-Synthase-Hexamere formen *Toxoplasma gondii*-Cristae. **A**, Struktur der *T. gondii*-ATP-Synthase mit Dimer-Winkel von lediglich 19°. **B**, Hexamer mit Detergensring (gelb) und lumenalen Untereinheit ATPTG11 (grün). **C**, *in situ*-Struktur der ATP-Synthase-Pyramiden in mitochondrialen Membranen. **D**, Kryo-Tomogramme mit Subtomogramm-Mittelungen (gelb) aus Wildtyp und der ATPTG11-KO-Mutante, welche keine Hexamere aufweist [6].

■ Mitochondrien sind Zellorganellen mit zentraler Funktion in zellulären Prozessen, wie Metabolismus, Signaltransduktion und Zellatmung. Sie weisen ein kompliziertes Membransystem mit einer stark gefalteten inneren Mitochondrienmembran auf. Die Einstülpungen der inneren Membran werden als Cristae bezeichnet und sind über enge Verbindungen, den Cristae-Junctions, mit der inneren Grenzmembran verbunden. Der Erhalt dieser komplexen Membranarchitektur ist essenziell für die physiologische Funktion dieser Organellen. Eine Schlüsselrolle nimmt hierbei die ATP-Synthase ein, welche auch einen Großteil des Energiebedarfs fast aller Zellen deckt. Im Gegensatz zu den Homologen aus Bakterien und Chloroplasten, die als Monomere in der Membran vorliegen, bilden ATP-Synthasen in Mitochondrien Dimere, welche sich zu langen Reihen zusammenlagern und dadurch Membrankrümmung verursachen [1]. Jedoch unterscheiden sich die resultierenden Cristae-Morphologien in verschiedenen Organismen stark. Beispielsweise weisen viele medizinisch relevante Parasiten Cristae-Strukturen auf, die sich prägnant von den flachen, lamellar angeordneten Cristae ihrer menschlichen Wirtszellen unterscheiden. So zeigten Ultradünnschnitte des Toxoplasma-Erregers *Toxoplasma gondii* kolbenartige Cristae [2]. Hingegen weist das Mitochondrion des Schlafkrankheits-Erregers *Trypanosoma brucei* scheibenartige Cristae auf [3]. Strukturbestimmungen von Dimeren und *in situ*-Strukturen aus verschiedenen Organismen haben gezeigt, dass beträchtliche Unterschiede in der Zusammensetzung von Untereinheiten in ATP-Synthasen und deren Überstrukturen bestehen [1]. Auch die ATP-Synthasen der beiden Humanparasiten weisen phylumspezifische Untereinheiten auf, jedoch blieben deren Funktion, Auswirkungen auf die Struktur, sowie die Cristae-Morphologie bislang weitgehend ungeklärt [4, 5]. In zwei Studien konnte die molekulare Grundlage der Cristae-Biogenese durch die ATP-Synthase in *T. gondii* und *T. brucei* durch Strukturbestimmung mittels Kryoelektronenmikroskopie

(Kryo-EM) und biochemischer Charakterisierung aufgedeckt werden [6, 7].

Hexamere der ATP-Synthase formen Cristae in *Toxoplasma gondii*

Mittels Kryo-EM konnte die Struktur des ATP-Synthase-Dimers aus *T. gondii* bei 3 Å Auflösung bestimmt werden (**Abb. 1A**). Der 2-MDa-Proteinkomplex enthält 17 Apicomplexa-spezifische Untereinheiten (ATPTG1-17), welche zu einer stark vergrößerten, membrangebundenen F_0 -Region beitragen. Während in der Dimerstruktur aus Säugetieren die beiden F_1/C -Ring-Subkomplexe in einem weiten Winkel von 100° zueinanderstehen, beträgt dieser in *T. gondii* lediglich 19° , wodurch kaum Membrankrümmung induziert wird. Die weitere Kryo-EM-Strukturbestimmung einer oligomeren Form der ATP-Synthase zeigte ein C_3 -symmetrisches Hexamer, in welchem drei Dimere durch Wechselwirkungen zwischen parasitenspezifischen Domänen im Lumenbereich zusammengehalten werden. Jedoch zeigten der umgebende Detergensring und die zwi-

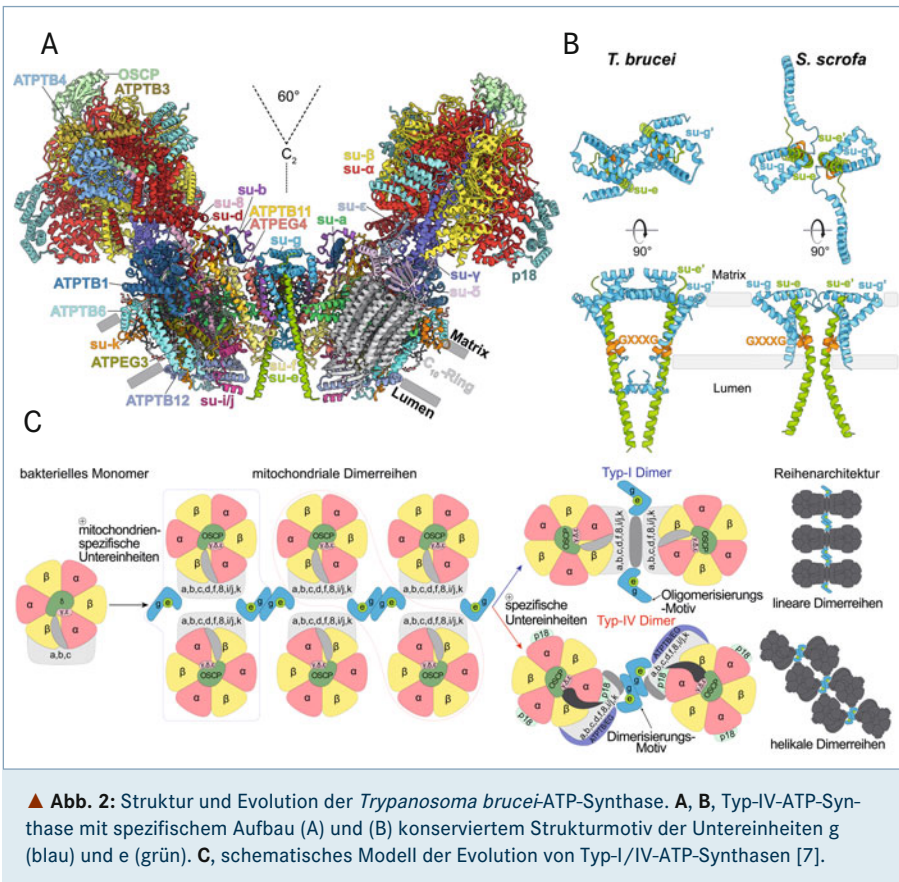
schenden Dimeren gespannte, flache Lipiddoppelschicht, dass auch die Bildung von ATP-Synthase-Hexameren kaum zur Membrankrümmung beiträgt (**Abb. 1B**). Durch die Verwendung von Kryoelektronen-Tomographie an mitochondrialen Membranen und Subtomogramm-Mittelung konnte die native Organisation der ATP-Synthase aufgelöst werden. Die *in situ*-Struktur zeigte, dass sich Hexamere in den apikalen Membranregionen in fünfseitigen Pyramiden von ~20 Megadalton anordnen (**Abb. 1C**). Die Zusammenlagerung von jeweils zehn ATP-Synthase-Dimeren mit ikosahedrischer Symmetrie bedingt hierbei Assoziationswinkel von 45° zwischen benachbarten Hexameren bzw. 40° zur zentralen Pentamer-Einheit. Diese gewinkelte Anordnung erzeugt eine kuppelförmige Membranform mit einem Krümmungsradius von etwa 30 Nanometern, welche die für den Parasiten charakteristische, kolbenförmige Cristae-Morphologie generiert. Damit unterscheidet sich die Überstruktur der *T. gondii*-ATP-Synthase von den langen Dimerreihen, von

denen zuvor angenommen wurde, dass sie in Mitochondrien aller Organismen auftreten.

Die Hexamer- und *in situ*-Strukturen zeigten weiterhin, dass die Kontakte zwischen den Dimeren über die Lumenbereiche erfolgen, wobei die Untereinheit ATPTG11 eine prominente Rolle einnimmt und zahlreiche Interaktionen zum benachbarten Dimer herstellt. Mittels CRISPR-Cas-Technologie wurde ein Knock-out von ATPTG11 vorgenommen. Dies führte zum Verlust der fünfseitigen Pyramiden und Hexamer-Einheiten bei unregelmäßiger Anordnung der verbleibenden Dimere sowie zu ungewöhnlichen, tubulär geformten Cristae (**Abb. 1D**). Bei der gleichzeitigen Kultivierung von Wildtyp- und ATPTG11-KO-Parasiten in derselben Wirtszellpopulation, nahm die relative Häufigkeit der Mutante im Verlauf der Kultivierung ab, was auf eine verminderte kompetitive Fitness deutet. Zusammengenommen zeigen diese Ergebnisse, dass die einzigartige makromolekulare Anordnung entscheidend für die Aufrechterhaltung der Cristae-

Hier steht
eine Anzeige.

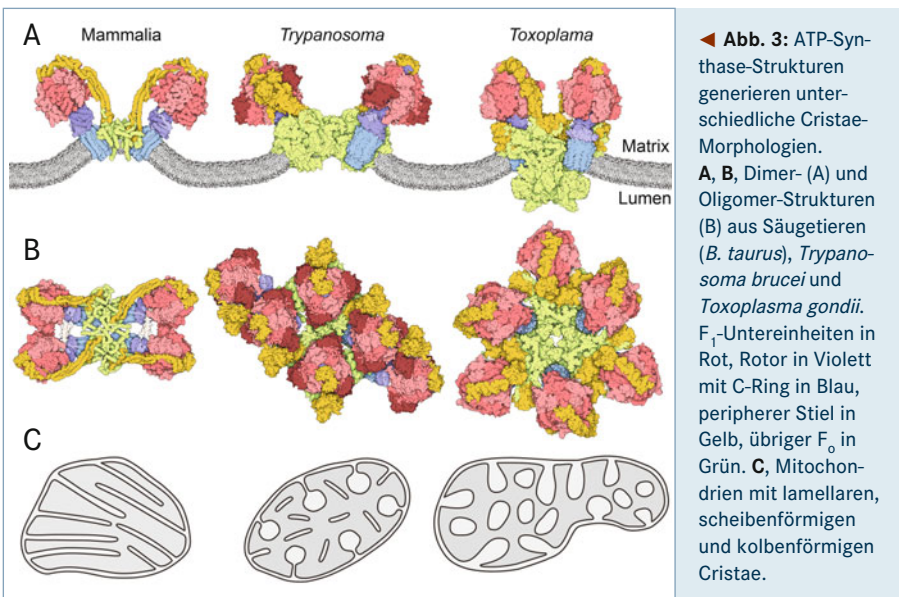
 Springer



hen (**Abb. 2A**). Die Dimerisierung erfolgt durch homotypische Interaktionen der Untereinheit g, welche nur durch strukturelle Ähnlichkeit zum Säugetierhomolog identifiziert werden konnte und über ein konserviertes GX₃G-Motiv mit Untereinheit e interagiert (**Abb. 2B**). RNA-Interferenz-Experimente (RNAi) von allen F₀-Untereinheiten resultieren in einem Zerfall des ATP-Synthase-Komplexes, mit der Ausnahme von Untereinheit g, deren Knock-down lediglich zu einer Monomerisierung des Komplexes und stark veränderten, ballonartigen Cristae-Strukturen führte. Fluoreszenzmessungen zeigten zudem, dass ein Knock-down der Untereinheit g zu einem verminderten Membranpotenzial im Vergleich zu unbehandelten Parasiten führte. Dies legt nahe, dass neben der katalytischen Aktivität der ATP-Synthase-Monomere die mit der Dimerisierung einhergehende Faltung der inneren Membran für normalen mitochondrialen Energiestoffwechsel unerlässlich ist.

Die Funktion der *T. brucei*-Untereinheit g als Dimerisierungsmotiv ist ungewöhnlich, da die beiden Kopien dieser Untereinheit in der Struktur der ATP-Synthase aus Bäckerhefe auf gegenüberliegenden Seiten der Längsachse des Dimers liegen und nicht miteinander interagieren [8]. Die Struktur des ATP-Synthase-Tetramers aus dem Rind zeigte, dass Dimere der Untereinheit g benachbarte ATP-Synthase-Dimere entlang der Dimerreihe verbinden [9]. In einem vorgeschlagenen evolutionären Modell, welches diese gegensätzlichen Beobachtungen erklären könnte, erfolgte in einem gemeinsamen Vorfahren die Zusammenlagerung von ATP-Synthasen proteobakteriellen Ursprungs zu Doppelreihen über Dimere der Untereinheit g. Die anschließende Akquisition von phylumspezifischen Untereinheiten führte entweder zur Dimerbildung zwischen direkt oder diagonal gegenüberliegenden Monomeren. Dies würde sowohl die beobachtete Funktion der Untereinheit g als Oligomerisierungsmotiv in Typ-I-ATP-Synthasen (z. B. Säugetiere) bzw. Dimerisierungsmotiv in Typ-IV-ATP-Synthasen (z. B. *T. brucei*) erklären als auch die unterschiedliche Position der peripheren Stiele in deren Strukturen (**Abb. 2C**).

Damit liefert die *T. brucei*-ATP-Synthase-Struktur erstmals Hinweise, dass Strukturelemente, welche zur Oligomerisierung bzw. Dimerisierung beitragen, zwischen verschiedenen Phyla konserviert sind. Aufgrund der stark unterschiedlichen Dimerstrukturen



◀ **Abb. 3:** ATP-Synthase-Strukturen generieren unterschiedliche Cristae-Morphologien. **A, B,** Dimer- (**A**) und Oligomer-Strukturen (**B**) aus Säugetieren (*B. taurus*), *Trypanosoma brucei* und *Toxoplasma gondii*. F₁-Untereinheiten in Rot, Rotor in Violett mit C-Ring in Blau, peripherer Stiel in Gelb, übriger F₀ in Grün. **C,** Mitochondrien mit lamellaren, scheibenförmigen und kolbenförmigen Cristae.

Morphologie und der vollen mitochondrialen Funktion in Apicomplexa-Parasiten ist.

Evolution mitochondrialer ATP-Synthasen

Neben einer einzigartigen Biologie und einer komplexen Genomstruktur, weist das Mitochondrion des Schlafkrankheitsparasiten *Trypanosoma brucei* eine spezifische, schei-

benförmige Cristae-Struktur auf. Diese Membranmorphologie wird durch kurze, helikal gewundene Dimerreihen definiert [3]. Hochauflösende Kryo-EM-Strukturbestimmung zeigte, dass das Dimer aus 25 Untereinheiten besteht, darunter 11 phylumspezifische, welche eine ungewöhnliche Struktur bedingen, in der die peripheren Stiele auf gegenüberliegenden Seiten der Dimer-Längsachse ste-

und Untereinheiten-Zusammensetzung wurde bisher angenommen, dass die Dimerisierung unabhängig voneinander erfolgt sei. Ob dies auf Phyla zutrifft, in denen bisher kein Homolog der Untereinheit *g* gefunden wurde, könnte durch weitere phylogenetische Analysen, Strukturbestimmungen und Aufschlüsselung der Evolution mitochondrialer ATP-Synthasen geklärt werden. Des Weiteren sind grundlegende Unterschiede in der Effizienz der verschiedenen ATP-Synthasen bekannt. Weil jede vollständige Umdrehung des Rotors zur Synthese von drei ATP-Molekülen führt, legt die Stöchiometrie des C-Rings fest, wie viele Protonen aus dem Protonengradienten hierfür verwendet werden müssen. Während sowohl in *Trypanosoma* als auch *Toxoplasma*-Parasiten hierfür zehn Protonen nötig sind (C₁₀-Ringe) [6, 7], genügen in Säugetieren und vermutlich allen Wirbeltieren acht Protonen (C₈-Ringe) [10]. Dies könnte darauf hindeuten, dass in Säugetier-Mitochondrien ein stärkerer elektrochemischer Gradient vorliegt oder dass dieser in den Lebenszyklen einzelliger Organismen stärkeren Schwankungen unterliegt, weshalb eine dauerhafte ATP-Synthese nur mit größeren und ineffizienteren C-Ringen sichergestellt werden kann. Mittels supraauflösender Fluoreszenzmikroskopie konnte bereits gezeigt werden, dass die Cristae-Biogenese neben der Vergrößerung der Membranfläche auch zur Bildung eines hohen Membranpotenzials im Crista-Lumen führt [11]. Mögliche Zusammenhänge des elektrochemischen Potenzials, *in vivo*-Synthesera-

ten, Cristae-Morphologien und C-Ring-Stöchiometrien sind jedoch bislang kaum bekannt und gehören zu den offenen Fragen der mitochondrialen Bioenergetik.

Danksagung

Ich danke dem Personal der schwedischen Kryo-EM Infrastruktur-Plattform am SciLifeLab für die Unterstützung bei der Datenaufnahme. ■

Literatur

- [1] Kühlbrandt W (2019) Structure and mechanisms of F-type ATP synthases. *Annu Rev Biochem* 88: 515–549
- [2] Sheffield HG, Melton ML (1968) The fine structure and reproduction of *Toxoplasma gondii*. *J Parasitol* 54: 209–226
- [3] Mühleip AW, Dewar CE, Schnauffer A et al. (2017) *In situ* structure of trypanosomal ATP synthase dimer reveals a unique arrangement of catalytic subunits. *Proc Natl Acad Sci USA* 114: 992997
- [4] Zikova A, Schnauffer A, Dalley RA et al. (2009) The F₀F₁-ATP synthase complex contains novel subunits and is essential for procyclic *Trypanosoma brucei*. *PLoS Pathog* 5: e1000436
- [5] Huet D, Rajendran E, van Dooren GG, Lourido S (2018) Identification of cryptic subunits from an apicomplexan ATP synthase. *eLife* 7: e38097
- [6] Mühleip A, Kock Flygaard R, Ovciarikova J et al. (2021) ATP synthase hexamer assemblies shape cristae of *Toxoplasma* mitochondria. *Nat Commun* 12: 120
- [7] Gahura O, Mühleip A, Hierro-Yap C et al. (2022) An ancestral interaction module promotes oligomerization in divergent mitochondrial ATP synthases. *bioRxiv*, DOI: <https://doi.org/10.1101/2021.10.10.463820>

- [8] Guo H, Bueler SA, Rubinstein JL (2017) Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase. *Science* 358: 936–940
- [9] Gu J, Zhang L, Zong S et al. (2019) Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science* 364: 1068–1075
- [10] Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ et al. (2010) Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 16823–16827
- [11] Wolf DM, Segawa M, Kondadi AK et al. (2019) Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J*: e101056

Funding note: Open Access funding enabled and organized by Stockholm University.

Open Access: Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsgemäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden. Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen. Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Korrespondenzadresse:

Dr. Alexander Mühleip
Science for Life Laboratory
Department of Biochemistry and Biophysics,
Stockholm University
Tomtebodavägen 23
S-17165 Solna
alexander.muheip@scilifelab.se

AUTOR



Alexander Mühleip

2007–2012 Studium der Biochemie an der Goethe-Universität Frankfurt a. M. Danach bis 2017 Promotion am Max-Planck-Institut für Biophysik, Frankfurt a. M. Seitdem Postdoktorand in der Abteilung für Biochemie und Biophysik der Universität Stockholm, Schweden.