

## Strukturbiologie von Membranproteinen

# Mitochondrialer Komplex I – Analyse einer molekularen Maschine

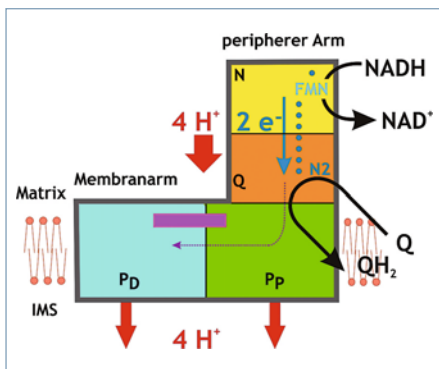
VOLKER ZICKERMANN<sup>1</sup>, CAROLA HUNTE<sup>2</sup>, ULRICH BRANDT<sup>1</sup>

<sup>1</sup>MOLEKULARE BIOENERGETIK, FACHBEREICH MEDIZIN; CLUSTER OF EXCELLENCE FRANKFURT „MACROMOLECULAR COMPLEXES“, CENTER FOR MEMBRANE PROTEOMICS, UNIVERSITÄT FRANKFURT A. M.

<sup>2</sup>BOSS CENTRE FOR BIOLOGICAL SIGNALLING STUDIES, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE UND MOLEKULARBIOLOGIE, ZBMZ, UNIVERSITÄT FREIBURG

**Der respiratorische Komplex I ist ein sehr großes Membranprotein mit einer Schlüsselstellung im aeroben Energiestoffwechsel. Die kürzlich durch Röntgenkristallografie aufgeklärte Anordnung funktionaler Module hat weitreichende Implikationen für den bisher unbekanntenen Mechanismus der Redox-gekoppelten Protonentranslokation.**

Respiratory complex I is a very large membrane protein with a key function in aerobic energy metabolism. The arrangement of functional modules as recently determined by X-ray crystallography provides strong clues on the mechanism of redox-linked proton translocation.



▲ **Abb. 1:** Komplex I lässt sich in funktionale Module unterteilen. Der periphere Arm enthält das N-Modul (N, gelb) und das Q-Modul (Q, orange). Elektronen werden vom primären Akzeptor FMN über eine Kette von Eisen-Schwefel-Zentren (blaue Kreise) zum Zentrum N<sub>2</sub> transportiert und von dort auf Ubichinon (Q) übertragen. Die Energie der Redoxreaktion wird in ein elektrochemisches Membranpotenzial umgewandelt. Die Translokation von Protonen von der Matrix in den Intermembranraum (IMS) erfolgt durch ein distales und ein proximales Pumpmodul (P<sub>d</sub>, türkis; P<sub>p</sub>, grün). Wir schlagen vor, dass die Kopplung über Konformationsänderungen (violetter Pfeil) und unter Beteiligung der sogenannten Transmissionshelix (violett) erfolgt. Weitere Details im Text.

■ Für aerobe organotrophe Organismen ist die oxidative Phosphorylierung die effizienteste und mit Abstand wichtigste Art der Energiegewinnung. In Mitochondrien nutzen die Redox-getriebenen Protonenpumpen der Atmungskette die Energie verschiedener Elektronentransferreaktionen, um einen elektrochemischen Potenzialgradienten über der inneren Mitochondrienmembran aufzubauen. In ihm steckt die Triebkraft für die eigentliche ATP-Synthese durch den ATP-Synthase-Komplex. Der respiratorische Komplex I (protonenpumpende NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase [1]) katalysiert die Elektronenübertragung von NADH auf Ubichinon und leitet somit die energetische Nutzung von zahlreichen Schritten im katabolen Stoffwechsel ein, bei denen „Wasserstoff“ auf NAD<sup>+</sup> übertragen und zwischengespeichert wurde. Pro Umsatz eines Substratmoleküls und Transfer von zwei Elektronen werden vier Protonen von der mitochondrialen Matrix in den Intermembranraum gepumpt. Damit trägt Komplex I etwa 40 Prozent zur protonenmotorischen Kraft bei, die durch die Atmungskette insgesamt erzeugt wird. Fehlfunktionen von Komplex I, die einerseits die Effizienz der ATP-Synthese beeinträchtigen,

aber auch zu einer vermehrten Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) führen können, sind Ursache von Encephalomyopathien und neurodegenerativen Erkrankungen.

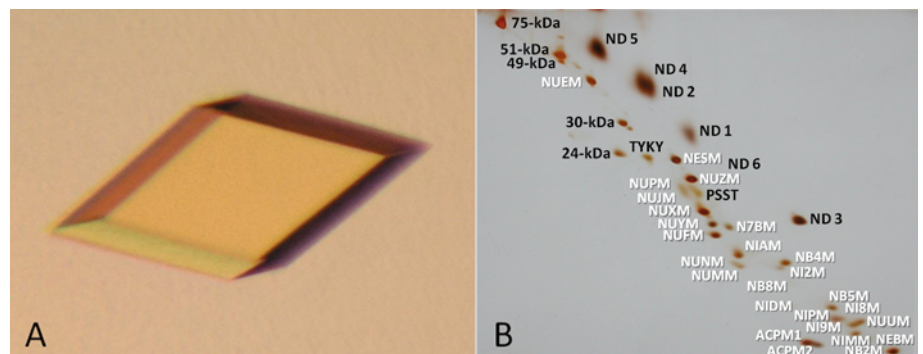
Komplex I ist ein sehr großes und kompliziert aufgebautes Membranprotein. In Säugetieren besteht der Enzymkomplex aus 45 Untereinheiten und hat eine Gesamtmasse von annähernd einem Megadalton. Als einfacheres Modellsystem dient der Enzymkomplex aus Bakterien, der typischerweise „nur“ 14 Untereinheiten enthält. Diese 14 zentralen Untereinheiten sind durchgängig von den Bakterien bis zum Menschen konserviert und können verschiedenen funktionalen Modulen zugeordnet werden. Es handelt sich dabei um das N-Modul (NADH-Oxidation), das Q-Modul (Ubichinon-Reduktion) und das P-Modul (Protonenpumpen). Das N-Modul und das Q-Modul enthalten alle Redox-aktiven prosthetischen Gruppen, Flavinmononucleotid (FMN) und acht kanonische Eisen-Schwefel-Zentren. Zusätzlich zu den zentralen Untereinheiten werden in Komplex I eine spezieabhängige Anzahl von akzessorischen Untereinheiten gefunden (**Abb. 1**).

Die elektronenmikroskopische Struktur von Komplex I aus Prokaryoten und Eukaryoten weist eine charakteristische L-Form auf, die sich in einen peripheren Arm und einen Membranarm unterteilen lässt (**Abb. 1**, [2]). Durch Röntgenkristallografie wurde die Struktur des peripheren Arms von Komplex I aus dem thermophilen Bakterium *Thermus thermophilus* mit einer Auflösung von 3,1 Angström bestimmt [3]. Strukturmodelle mit mittlerer Auflösung konnten kürzlich auch für den gesamten Komplex I aus *T. thermophilus* und für den fast vollständigen Membranarm von Komplex I aus *Escherichia coli* generiert werden [4].

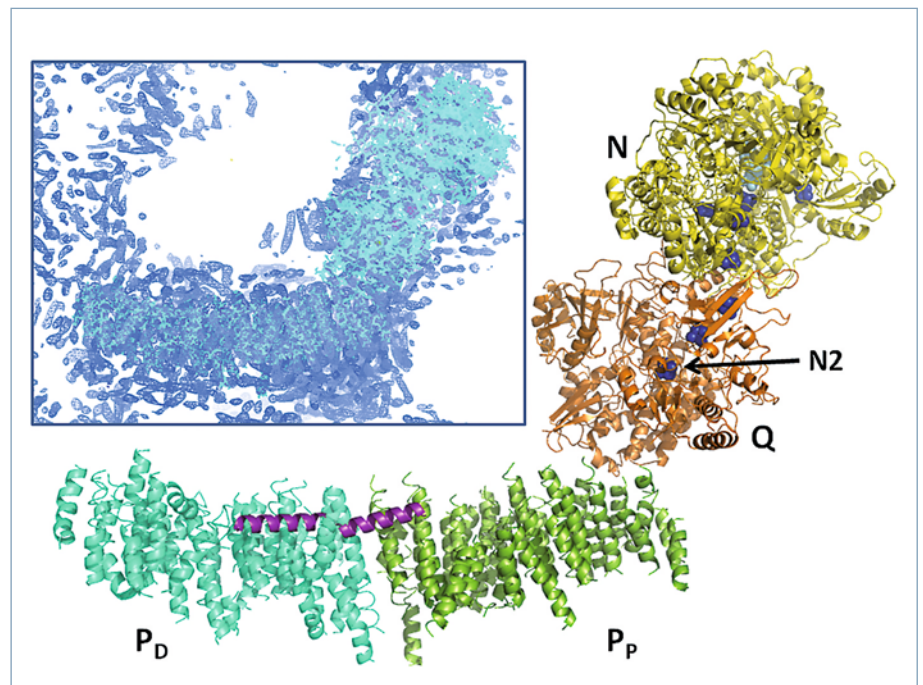
Unsere Arbeitsgruppen haben sich seit mehr als zehn Jahren mit der Strukturaufklärung des wesentlich komplexer aufgebauten mitochondrialen Enzyms beschäftigt [5]. Da Komplex I im eukaryotischen Standardmodellorganismus *Saccharomyces cerevisiae* fehlt und durch alternative NADH-Dehydro-

genasen (NDH-2) ersetzt ist, wurde die strikt aerobe Hefe *Yarrowia lipolytica* als hefegenetisches Modellsystem etabliert. Komplex I aus *Y. lipolytica* (42 Untereinheiten, ca. 960 Kildalton) kann durch His-Tag-Affinitätschromatografie problemlos in großen Mengen isoliert werden und kristallisierte nach zahlreichen Optimierungsschritten in der Raumgruppe H32 mit  $a, b = 319$  Angström und  $c = 820$  Angström (**Abb. 2**). Neben der generell geringen Tendenz von Membranproteinen, geordnete Kristalle zu bilden, waren die außergewöhnliche Größe der Zellkonstanten, die inhärente strukturelle Flexibilität von Komplex I und die hohe Empfindlichkeit unserer Kristalle gegenüber Röntgenstrahlung weitere Herausforderungen für die kristallografische Analyse. Die experimentellen Elektronendichtekarten (**Abb. 3**, Box) zeigen bei einer Auflösung von derzeit 6,3 Angström die Gesamtarchitektur von Komplex I bis zur Ebene der Sekundärstruktur. Konservierte Sekundärstrukturmodule und die durch anomale Fourier-Analyse gut bestimmten Positionen der Eisen-Schwefel-Zentren ermöglichten, die Teilstruktur des bakteriellen peripheren Arms in die Elektronendichte des mitochondrialen Komplexes I zu modellieren, während für die Transmembransegmente des Membranarms ein  $\alpha$ -helikales Modell generiert wurde (**Abb. 3**).

Im N-Modul befinden sich in Elektronentransferdistanz zum FMN zwei unterschiedliche Eisen-Schwefel-Zentren. Das eine Zentrum hat vermutlich eine Funktion in einem Mechanismus, der die Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies am FMN unterdrücken soll. Das andere Zentrum ist Ausgangspunkt einer linearen Elektronentransferkette aus insgesamt sieben Eisen-Schwefel-Zentren, die in Richtung Membranarm führt. Bemerkenswerterweise endet diese Kette im Q-Modul etwa 30 Angström oberhalb der angenommenen Membranebene mit dem Zentrum N2, das als der direkte Elektronendonator für das Ubichinon angesehen wird (**Abb. 1 und 3**). Im Vergleich z. B. zum mitochondrialen Kom-



▲ **Abb. 2:** Kristallisation von Komplex I aus der Hefe *Yarrowia lipolytica*. **A**, Kristall. **B**, dSDS-Gel eines aufgelösten Kristalls nach Silberfärbung; zentrale Untereinheiten (schwarz), akzessorische Untereinheiten (weiß) (Angerer et al., zur Veröffentlichung eingereicht).



▲ **Abb. 3:** Strukturmodell für Komplex I. Farbcodierung und Bezeichnungen wie in Abbildung 1. Die Box zeigt einen Ausschnitt aus der Elektronendichtekarte (dunkelblau) mit dem Strukturmodell in Cyan.

plex III nimmt das Ubichinon-reaktive Zentrum von Komplex I damit eine Sonderstellung ein. Da es sich offensichtlich nicht innerhalb oder in direkter Nähe der Lipiddoppel-

schicht befindet, muss das hydrophobe Substratmolekül die Membrenumgebung zumindest teilweise verlassen. Durch umfangreiche Mutagenesestudien konnte unsere Arbeits-

gruppe in zwei Untereinheiten des Q-Moduls zahlreiche Reste identifizieren, die für die Bindung von Ubichinon bzw. hydrophoben Inhibitoren von Bedeutung sind [6]. Ein spezifischer Tyrosinrest in unmittelbarer Nähe des Eisen-Schwefel-Zentrums N2 ist an der Bindung der Kopfgruppe des Ubichinons beteiligt. Als Gesamtbild ergibt sich eine ausgedehnte Bindungstasche, die einen Zugangsweg für Ubichinon aus der Membran bis zum eigentlichen katalytischen Zentrum im peripheren Arm in der Umgebung von Zentrum N2 eröffnet.

Während alle Elektronentransferschritte im peripheren Arm ablaufen, muss die Translokation von Protonen durch die Membran von zentralen Untereinheiten des Membranarms bewerkstelligt werden. Die individuelle Beteiligung einzelner Untereinheiten am Protonenpumpen ist allerdings erst ansatzweise bekannt. Im Mittelpunkt des Interesses stehen die drei Untereinheiten ND2, ND4 und ND5 (**Abb. 2B**). Sie zeigen wechselseitige Sequenz- und Strukturhomologien, und sie sind homolog zu Untereinheiten der multiplen Kationen/Protonen-Antiporter-Komplexe vom Mrp-Typ, die in verschiedenen Bakterienspezies gefunden werden. Der Membranarm lässt sich in eine proximale und eine distale Subdomäne unterteilen (**Abb. 1 und 3**). Eine Reihe von strukturellen Daten belegen, dass die beiden Untereinheiten ND4 und ND5 im distalen Membranarm liegen, etwa 100 Angström vom peripheren Arm entfernt. Funktionelle Studien an Subkomplexen aus unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass ein Verlust der distalen Membranarmdomäne zu einer etwa halbierten Protonenpumpstöchiometrie führt (Dröse et al., zur Veröffentlichung eingereicht). Daraus lässt sich folgern, dass im Membranarm an mindestens zwei Positionen Protonen über die Membran gepumpt werden und dass diese Zentren auf ein distales und ein proximales Pumpmodul ( $P_p$  und  $P_D$ ) verteilt sind (**Abb. 1**).

Der Mechanismus der Energieumwandlung durch Komplex I ist weitgehend unbekannt. Die jetzt aufgeklärte Anordnung der funktionalen Module im Komplex I schließt eine direkte Kopplung von Elektronentransferreaktionen und Protonentranslokation aus, da beide Prozesse räumlich voneinander getrennt ablaufen [5]. Die Architektur von Komplex I ist somit von der der anderen Atmungskettenkomplexe deutlich verschieden und ein starkes Indiz für einen indirekten, konformativen Mechanismus. Bekannte Beispiele für konformativ gekoppelte Ionentransferre-

aktionen sind die Rotationskatalyse der F-Typ-ATP-Synthase und der Reaktionszyklus der sarkoplasmatischen P-Typ- $Ca^{2+}$ -ATPase. Experimentelle Erkenntnisse zu funktionalen Konformationsänderungen sind für Komplex I erst ansatzweise vorhanden. Jedoch geben die auf der Röntgenstrukturanalyse basierenden Strukturmodelle einen wichtigen Hinweis zum Energietransfer innerhalb des Membranarms. Das proximale und das distale Pumpmodul sind durch eine mindestens 60 Angström lange helikale Struktur miteinander verbunden, die lateral auf der Intermembranseite und parallel zur langen Achse des Membranarms verläuft („Transmissionshelix“, **Abb. 1 und 3**). Diese bisher aus keinem anderen Membranprotein bekannte strukturelle Anordnung scheint als molekulare Kuppelstange zu dienen und könnte eine zentrale Rolle bei der Energieübertragung vom proximalen zum distalen Pumpmodul spielen (**Abb. 1**).

### Fazit

Die hier vorgestellten Ergebnisse der Röntgenstrukturanalyse haben unser Verständnis vom respiratorischen Komplex I wesentlich erweitert. Es bleiben aber eine Reihe neuer und alter Fragen ungeklärt und eine Verbesserung der strukturellen Auflösung und die experimentelle Überprüfung der hier postulierten Konformationsänderungen sind vorrangige Aufgaben für die Zukunft.

### Danksagung

Die Autoren danken der DFG für die finanzielle Unterstützung (SFB 472, ZI 552/3-1, EXC115, EXC294) und dem ESRF und der SLS für die Gewährung von Messzeit. ■

### Literatur

- [1] Brandt U (2006) Energy converting NADH:quinone oxidoreductase (Complex I). *Annu Rev Biochem* 75:69–92
- [2] Clason T, Ruiz T, Schägger H et al. (2010) The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol* 169:81–88
- [3] Sazanov LA, Hinchliffe P (2006) Structure of the hydrophilic domain of respiratory complex I from *Thermus thermophilus*. *Science* 311:1430–1436
- [4] Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA (2010) The architecture of respiratory complex I. *Nature* 465:441–445
- [5] Hunte C, Zickermann V, Brandt U (2010) Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* 329:448–451
- [6] Tocilescu MA, Zickermann V, Zwicker K et al. (2010) Quinone binding and reduction by respiratory complex I. *Biochim Biophys Acta* 1797:1883–1890

### Korrespondenzadresse:

PD Dr. Volker Zickermann  
 Fachbereich Medizin, Molekulare Bioenergetik  
 Cluster of Excellence Frankfurt „Macromolecular Complexes“  
 ZBC – Zentrum für Biologische Chemie  
 Goethe-Universität Frankfurt a. M.  
 Theodor-Stern-Kai 7  
 D-60590 Frankfurt a. M.  
 Tel.: 069-6301-6927  
 Fax: 069-6301-6970  
 Zickermann@zbc.kgu.de

### AUTOREN



#### Volker Zickermann

Jahrgang 1966. 1986–1992 Biochemiestudium an der Universität Hannover, Diplomarbeit Medizinische Universität zu Lübeck. 1992–1996 Promotion Universität Frankfurt a. M. 1996–1998 Postdoktorand an der Universität Helsinki, Finnland. Seit 1998 wissenschaftlicher Mitarbeiter, Zentrum der Biologischen Chemie, Universität Frankfurt a. M., 2010 Habilitation für das Fach Biochemie.



#### Carola Hunte

Jahrgang 1962. 1982–1989 Biologiestudium an den Universitäten Bielefeld; Exeter, UK; Bonn. 1989–1993 Promotion. 1993–1994 wissenschaftliche Mitarbeiterin, Universität Bonn. 1995–1999 Postdoktorandin bei Prof. Dr. Michel, Max-Planck-Institut (MPI) für Biophysik, Frankfurt a. M. 2000–2007 Gruppenleiterin, MPI für Biophysik. 2007–2010 Chair in Membrane Biology, University of Leeds, UK. Seit 2010 W3-Professur für Biochemie mit Schwerpunkt Strukturbiologie, BIOS Centre for Biological Signalling Studies, Universität Freiburg.



#### Ulrich Brandt

Jahrgang 1961. 1980–1986 Biochemiestudium, Universität Tübingen. 1986–1989 Doktorand am Institut für Physikalische Biochemie der LMU München. 1990–1993 Forschungsaufenthalte: Universität Frankfurt a. M.; Glynn Research Institute, Bodmin, UK; Dartmouth Medical School, Hanover, NH, USA. 1994 Habilitation. Seit 1996 Professor für Biochemie. Seit 2009 geschäftsführender Direktor am Zentrum für Biologische Chemie der Universität Frankfurt a. M., Gründungsmitglied des Exzellenzclusters „Macromolecular Complexes“.