

# Innenansichten einer gigantischen Protonenpumpe

Ulrich Brandt\*

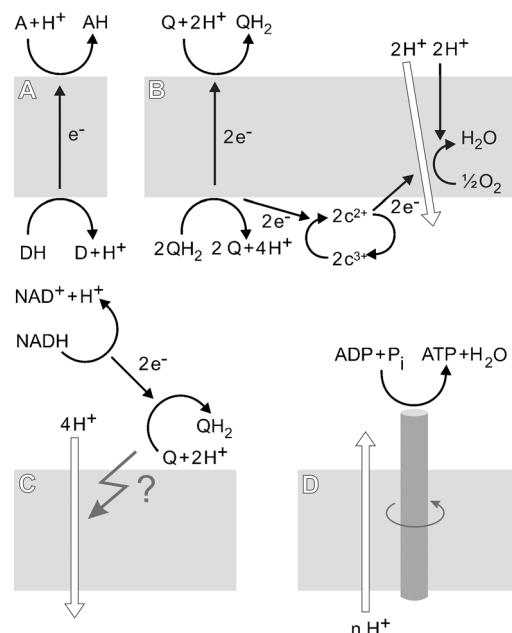
Bioenergetik · Komplex I · Protonenpumpen ·

Röntgenkristallographie · Ubichinon

Aerobe Zellen decken ihren Energiebedarf hauptsächlich durch ATP-Synthese mittels oxidativer Phosphorylierung. Bei diesem Vorgang wird Wasserstoff, der zuvor der Nahrung entzogen wurde, in eine Kette von Redoxenzymen eingespeist und letztlich zur Reduktion von molekularem Sauerstoff zu Wasser verwendet. In Eukaryoten finden diese Reaktionen in Mitochondrien, den „Kraftwerken“ der Zelle, statt, die in einem ruhenden Menschen pro Tag das Äquivalent von etwa 3000 Litern H<sub>2</sub> umsetzen.

Peter Mitchell hat die fundamentalen Prinzipien derartiger biologischer Brennstoffzellen vor mehr als 50 Jahren definiert, als er das inzwischen fest etablierte Konzept der chemiosmotischen Kopplung publizierte, demzufolge Elektronentransport in der Atmungskette die ATP-Synthese durch die Erzeugung eines Protonengradienten über die bioenergetische Membran antreibt.<sup>[1]</sup> Mitchells ursprünglicher Vorschlag einer Erzeugung der sogenannten protonenmotorische Kraft durch Redoxschleifen, die den Transport von Elektronen über die Membran mit der gerichteten Aufnahme von Protonen durch Substrate kombinieren (Schema 1 A), hat immer noch Gültigkeit. Die biochemische und strukturelle Analyse der beteiligten Atmungskettenkomplexe hat jedoch eine bemerkenswerte Vielfalt molekularer Mechanismen ans Licht gebracht, mit denen die Protonenpumpen arbeiten (Schema 1 B). Dazu gehören die raffinierte substratabhängige Übertragung im protonenpumpenden Q-Zyklus des Cytochrome-*bc*<sub>1</sub>-Komplexes (Komplex III) und lokalisierte Schaltermechanismen wie in der Cytochrome-*c*-Oxidase (Komplex IV).

Bemerkenswerterweise zeigen biochemische<sup>[2]</sup> und strukturelle Daten zum bakteriellen<sup>[3]</sup> und mitochondrialen<sup>[4]</sup> Komplex I der Atmungskette (protonenpumpende NADH: Ubichinon-Oxidoreduktase), dass die Redoxreaktion in der hydrophilen Domäne vollständig getrennt von den Protonenpumpen in der Membran ablaufen (Schema 1 C), was auf einen weiteren, indirekten Kopplungsmechanismus hinweist. Eine solche räumliche Trennung der chemischen Reaktionen vom transmembranen Protonentransport war zuvor für die



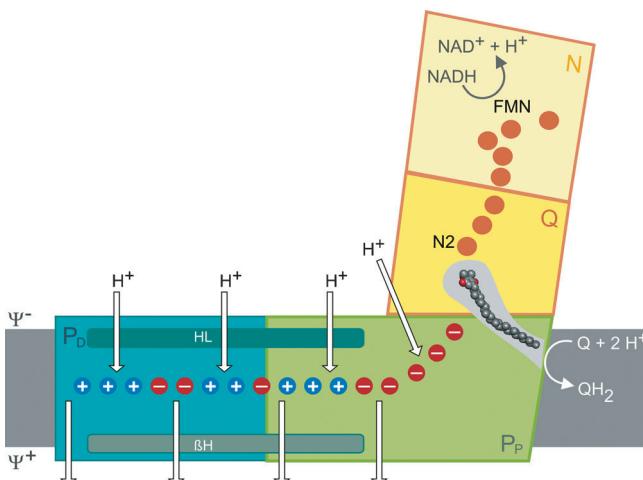
**Schema 1.** Protonenpumpen in der oxidativen Phosphorylierung. A) Einfache Redoxschleife; B) protonenpumpender Q-Zyklus im Komplex III (links) und Schalter-Pumpmechanismus im Komplex IV (rechts); C) indirekte Pumpe im Komplex I; Rotationsmechanismus der ATP-Synthase im Komplex V. Q = Ubichinon; c = Cytochrom c.

ATP-Synthase (Komplex V) beschrieben worden, in der die ATP-Synthese von der protonenmotorischen Kraft über einen einzigartigen Rotationsmechanismus angetrieben wird (Schema 1 D). Schon die ersten Strukturdaten zum Komplex I hatten auf einen anderen Mechanismus der Energieübertragung über eine große Distanz hingewiesen, aber wie genau Redoxchemie und Protonenpumpen miteinander gekoppelt sind, blieb ungeklärt.<sup>[3,4]</sup>

Komplex I koppelt den Elektronentransport von NADH auf den hydrophoben Wasserstoffüberträger Ubichinon mit dem vektoriellen Transport von vier Protonen über die bakterielle Plasmamembran oder die mitochondriale Innemembran.<sup>[5]</sup> In einigen Fällen verwendet dieses Enzym Menachinon als alternatives Substrat. Es handelt sich um den bei weitem größten Komplex der Atmungskette. Selbst in Bakterien, in denen das L-förmige, membranständige Enzym typischerweise aus 14 funktionell zentralen Untereinheiten zuzüglich einiger weniger weiterer Proteine besteht, hat es eine molekulare Masse von mehr als 500 kDa. Der mitochondriale Komplex verfügt über eine große Zahl weiterer,

[\*] Prof. Dr. U. Brandt  
Exzellenzcluster „Macromolecular Complexes“  
Goethe-Universität Frankfurt am Main (Deutschland)  
und  
Nijmegen Center for Mitochondrial Disorders, Radboud University  
Nijmegen Medical Center  
Geert Groteplein-Zuid 10, 6525 GA Nijmegen (Niederlande)  
E-Mail: u.brandt@cukz.umcn.nl

sogenannter akzessorischer Untereinheiten und erreicht damit eine Masse von fast 1 MDa. Im Komplex I können mehrere funktionelle Module unterschieden werden,<sup>[5]</sup> die definierten strukturelle Domänen entsprechen (Abbildung 1).<sup>[4]</sup> Vom NADH-oxidierenden N-Modul mit dem 2-zu-



**Abbildung 1.** Übersicht über die funktionellen Elemente von Komplex I. Im N-Modul fließen die Elektronen vom NADH in eine Kette von sieben Eisen-Schwefel-Zentren (orangefarbene Kreise). Sie werden dann vom terminalen Zentrum N2 auf ein Ubichinonmolekül (Kalottenmodell) übertragen, das in einer Tasche des Q-Moduls bindet, welche in den Membranarm hineinreicht. Eine lange Kette geladener Reste, die durch die Mitte des membranständigen P-Moduls reicht, verbindet die Q-Bindungstasche mit vier putativen Pumpstellen mit getrennten Kanälen für Protonenaufnahme und -abgabe. Eine lange laterale Helix (HL) und eine Reihe von  $\beta$ -Haarnadel-Helix-Elementen ( $\beta$ H) verbinden die proximale ( $P_p$ ) und distale ( $P_d$ ) Domäne des P-Moduls.

1-Elektronenkonverter FMN werden die Elektronen auf das Q-Modul übertragen, wo sich am Ende einer Kette von sieben Eisen-Schwefel-Zentren die Ubichinon-Reduktionsstelle befindet. Q- und N-Modul bilden den peripheren Arm von Komplex I, der nahezu rechtwinklig mit dem Ende des 180 Å langen Membranarms verbunden ist. Dieses P-Modul enthält die Protonenpumpen und ist in eine proximale und eine distale Domäne unterteilt, die jeweils für die Hälfte der Protonentransportaktivität zuständig sind.<sup>[6]</sup>

Die 3.3 Å Struktur des gesamten bakteriellen Komplexes I aus *Thermus thermophilus*<sup>[7]</sup> bietet nun ein vollständiges Bild aller Teile dieses bemerkenswert großen und komplizierten Enzyms. Es bietet einen detaillierten Einblick in die Verbindung zwischen den Redoxzentren des peripheren Arms und den Protonenpumpen des Membranarms und zeigt eine rund 300 Å lange, kontinuierliche Abfolge funktioneller Elemente, die alle Teile dieses gigantischen Multiproteinkomplexes umfasst, und die vom NADH-Oxidationszentrum an der Spitze des peripheren Arms ganz bis hin zur entferntesten Pumpstelle am Ende des Membranarms reicht (Abbildung 1). Zusätzlich zu den putativen Kanälen für die Protonenaufnahme und -abgabe, die zuvor in den drei Untereinheiten mit Homologie zu  $\text{Na}^+/\text{H}^+$ -Antiportern vom Mrp-Typ beschrieben wurden,<sup>[3]</sup> ist nun ein vierter paar putativer

Kanäle klar erkennbar, das durch den Membranteil, direkt an seinem Übergang zum peripheren Arm, verläuft und diesen möglicherweise direkt mit einbezieht. Obwohl eine Zahl von vier Pumpstellen im Komplex I sehr gut zur gemessenen Pumpstöchiometrie von  $4\text{H}^+/\text{e}^-$  passt, muss experimentell geprüft werden, ob alle diese putativen Kanäle tatsächlich aktiv sind.

Wie zuvor beschrieben,<sup>[2,4,8]</sup> binden die Kopfgruppe des Substrats Ubichinon und der chinonanaloge Hemmstoff Piericidin A an ein konserviertes Tyrosin neben dem terminalen Eisen-Schwefel-Zentrum N2 in einer großen amphipathischen Tasche des Q-Moduls etwa 25–30 Å über der Membranoberfläche.<sup>[7]</sup> Diese Tasche reicht als enger Kanal in das P-Modul hinein und öffnet so den Zugang zur Membrandomäne. Allerdings scheint ein derart beschränkter Zugangsweg einem effizienten Substrataustausch im Wege zu stehen. Dieses Problem könnte während des katalytischen Zyklus durch eine transiente Öffnung der Ubichinon-Bindungstasche gelöst werden. Andererseits passt die Ausbildung einer dicht geschlossenen Reaktionskammer sehr gut zu der Hypothese, dass eine strikte Kontrolle der Protonierung der anionischen Ubichinon-Intermediate entscheidend für die Energiekonvertierung im Komplex I ist.<sup>[9]</sup> Diese Vorstellung, und ein früherer Vorschlag, dass eine elektrostatische Kopplung für die Energieübertragung innerhalb des Komplexes I verantwortlich sein könnte,<sup>[10]</sup> werden auch dadurch gestützt, dass die Ubichinon-Bindungstasche sich am Anfang einer einzigartigen, ununterbrochenen Kette positiv und negativ geladener Reste zu befinden scheint, die größtenteils in der Mitte des Membranteils verläuft und die vier in der Struktur des P-Moduls sichtbaren putativen Kanalpaare zur Protonenaufnahme und -abgabe verbindet.<sup>[7]</sup> Es erscheint naheliegend, dass diese einzigartige Konstruktion entscheidend am Antrieb der Protonpumpen des Komplexes I beteiligt ist, jedoch muss zunächst eine Reihe wichtiger Fragen theoretisch und experimentell beantwortet werden, um dies zu beweisen: Wie werden die Ladungen sicher vor Wasser und Ionen geschützt, um eine strikte Kopplung sicherzustellen und eine unkontrollierte Dissipation der Energie zu verhindern? Sind Konformationsänderungen beteiligt oder erfolgt das Protonenpumpen ausschließlich über elektrostatisch kontrollierte apparante pK-Änderungen der beteiligten Reste? Wie wird zwischen Protonenaufnahme und -abgabe umgeschaltet? Arbeiten alle Pumpstellen synchron? Jedenfalls scheint die erstaunlich lange laterale Helix, die den distalen und den proximalen Teil des P-Moduls verbindet, zusammen mit den  $\beta$ -Haarnadel-Helix-Elementen auf der anderen Seite der Membran lediglich die Struktur der Membrandomäne zu stabilisieren und nicht wie zuvor vorgeschlagen eine aktive Rolle im Pumpmechanismus zu spielen.<sup>[3,4]</sup>

Die Struktur des gesamten bakteriellen Komplexes I bietet eindrucksvolle Innenansichten einer faszinierenden molekularen Maschine.<sup>[7]</sup> Wir fangen gerade erst an zu verstehen, wie Komplex I als redoxgetriebene Protonpumpe funktionieren könnte. Seine schiere Größe und Komplexität, eine Bindungsstelle in der hydrophilen Domäne für ein hydrophobes Substrat und eine erstaunlich lange Kette geladener Reste, die in der Mitte der Membran verläuft, bedeuten

eine große Herausforderung für zukünftige strukturelle und funktionelle Untersuchungen.

Eingegangen am 22. April 2013  
Online veröffentlicht am 23. Mai 2013

- 
- [1] P. Mitchell, *Nature* **1961**, *191*, 144–148; P. Mitchell, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2011**, *1807*, 1507–1538.
  - [2] V. Zickermann, M. Bostina, C. Hunte, T. Ruiz, M. Radermacher, U. Brandt, *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 29072–29078.
  - [3] R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov, *Nature* **2010**, *465*, 441–445.
  - [4] C. Hunte, V. Zickermann, U. Brandt, *Science* **2010**, *329*, 448–451.
  - [5] U. Brandt, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 69–92.
  - [6] S. Dröse, S. Krack, L. Sokolova, K. Zwicker, H. D. Barth, N. Morgner, H. Heide, M. Steger, E. Nübel, V. Zickermann, S. Kerscher, B. Brutschy, M. Radermacher, U. Brandt, *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001128.
  - [7] R. Baradaran, J. M. Berrisford, G. S. Minhas, L. A. Sazanov, *Nature* **2013**, *494*, 443–448.
  - [8] M. A. Tocilescu, U. Fendel, K. Zwicker, S. Kerscher, U. Brandt, *J. Biol. Chem.* **2007**, *282*, 29514–29520.
  - [9] U. Brandt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2011**, *1807*, 1364–1369.
  - [10] L. Euro, G. Belevich, M. I. Verkhovsky, M. Wikström, M. Verkhovskaya, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2008**, *1777*, 1166–1172.
-