

Die Elektronentunnelraten im Atmungskettenkomplex I sind auf eine effiziente Energiewandlung abgestimmt**

Simon de Vries,* Katerina Dörner, Marc J. F. Strampraad und Thorsten Friedrich*

Abstract: Der Atmungskettenkomplex I wandelt die freie Energie, die bei der Reduktion von Ubichinon durch NADH frei wird, in einen Protonengradienten über die Membran um. Die biologische Redoxreaktion wird von einem Flavinmononukleotid und einer Kette von sieben Eisen-Schwefel-Zentren katalysiert. Die Elektronentransfargeschwindigkeiten zwischen den Zentren wurden über eine schnelle „Freeze-Quench“-Methode und Analyse der Proben mittels EPR- und UV/Vis-Spektroskopie bestimmt. Der Komplex I oxidiert sehr schnell drei Moleküle NADH; dabei hängt die Elektronentunnelrate zwischen den beiden Zentren der Kette mit dem größten Abstand zueinander vom Redoxzustand des distalen Zentrums N2 ab. Diese Geschwindigkeit ist sechsmal geringer, wenn N2 im reduzierten Zustand vorliegt. Die konformativen Änderungen, die mit der Reduktion des Zentrums N2 einhergehen, verlangsamen die elektronische Kopplung des längsten Transferschritts. Die Kette der Eisen-Schwefel-Zentren ist somit nicht einfach ein Draht für den Elektronentransfer, sondern sie passt die Elektronentunnelraten der Zeitskala der konformativen Bewegungen an, die für die Protonentranslokation benötigt werden. Die Synchronisierung von Geschwindigkeiten ist ein generelles Prinzip, um die Spezifität enzymatischer Reaktionen zu erhöhen.

Die NADH:Ubichinon-Oxidoreduktase, der respiratorische Komplex I, ist der erste Enzymkomplex der bakteriellen und mitochondrialen Atmungsketten. Die freie Energie der Redoxreaktion treibt die Translokation von vier Protonen über die Membran^[1] (Abbildung 1) und trägt damit zum

Aufbau der protonenmotorischen Kraft bei, die für energieverbrauchende Prozesse benötigt wird. Komplex I besteht aus einem peripheren Arm, der sich in die wässrige Phase erstreckt, und einem Membranarm, der sich in der Lipid-Doppelschicht befindet. Der periphere Arm katalysiert den Elektronentransfer von NADH auf Ubichinon (Q) mittels eines Flavinmononukleotids (FMN) und einer Kette von sieben Eisen-Schwefel(FeS)-Zentren (Abbildung 1). Ein weiteres Zentrum, N1a, befindet sich nahe zum FMN auf der gegenüberliegenden Seite der Kette. Die strukturell definierten Zentren wurden mittels DEER-Spektroskopie den EPR-Signalen zugeordnet (Abbildung 1B).^[2] Die Q-Bindestelle ist an der Kontaktstelle von peripherem Arm und Membranarm lokalisiert.^[3] Aufgrund struktureller und funktionaler Daten wurde vorgeschlagen, dass der Elektronentransfer und die Protonentranslokation über konformative Änderungen gekoppelt sind, die durch die Reduktion von N2 und Q induziert und dann auf vier Protonenkanäle übertragen werden (Abbildung 1).^[3b,4] Die Geschwindigkeit der Elektronenübertragung von NADH auf Q des Komplex I aus *Escherichia coli* wurde zu 150–200 s⁻¹ bestimmt.^[5] Darin enthalten ist der längste Elektronentunnelabstand von 14.1 Å zwischen den Zentren 4Fe[75]H und N4 (Abbildung 1). Die Halbwertszeit dieses Elektronentransferschritts wurde je nach den Randbedingungen der Marcus-Theorie zu 70 µs,^[6] 95 µs^[7] und 275 µs^[8] berechnet. Die des Transfers zwischen den Zentren N1b und 4Fe[75]C wurden zu $t_{1/2} = 5\text{--}10\text{ µs}$ und die der übrigen Schritte zu $t_{1/2} = 25\text{--}400\text{ ns}$ berechnet.^[6–8] Kürzlich wurde die Elektronenübertragung im Komplex I mittels EPR-Spektroskopie an schnell eingefrorenen Proben untersucht.^[9] Dabei wurde eine schnelle Reduktion der Zentren N2 und N1a mit $t_{1/2} \approx 60\text{ µs}$ durch das erste NADH beobachtet.^[9] Die Reduktion der Zentren N1b und N4 durch das zweite NADH war mit $t_{1/2} \approx 1\text{ ms}$ deutlich langsamer, was auf die langsame Dissoziation des NAD⁺ vom Komplex zurückgeführt wurde.^[9]

Wir haben die Reaktion von NADH mit einer hochreinen Probe des *E. coli* Komplex I^[10] in Gegenwart und Abwesenheit des spezifischen Inhibitors Piericidin A, der in der Q-Tasche bindet, anhand der Redoxzustände des FMN und der FeS-Zentren quantitativ analysiert. Durch methodische Unterschiede beim „Freeze-Quench“^[11] unterscheiden sich sowohl die experimentellen Daten als auch deren Interpretation von der vorherigen Veröffentlichung.^[9] Die Funktion des distalen Zentrums N2 für die Synchronisierung von Elektronentunneln und die Protonentranslokation wird aufgezeigt.

Zuerst wurde die Anzahl der von Komplex I oxidierten NADH-Moleküle bestimmt (Abbildung S1 in den Hintergrundinformationen) und die Gleichgewichtsverteilung der

[*] Prof. Dr. S. de Vries, M. J. F. Strampraad
Department of Biotechnology
Institution Delft University of Technology
Julianalaan 67, 2628 BC, Delft (Niederlande)
E-Mail: s.devries@tudelft.nl

Dr. K. Dörner, Prof. Dr. T. Friedrich
Institut für Biochemie, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg
Albertstraße 21, 79104 Freiburg (Deutschland)
E-Mail: friedrich@bio.chemie.uni-freiburg.de

[**] Diese Arbeit wurde von der Netherlands Organization for Scientific Research (NWO) und der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) unterstützt.

Hintergrundinformationen zu diesem Beitrag sind im WWW unter <http://dx.doi.org/10.1002/ange.201410967> zu finden.

© 2015 Die Autoren. Veröffentlicht von Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Dieser Open Access Beitrag steht unter den Bedingungen der Creative Commons Attribution Non-Commercial NoDerivs License, die eine Nutzung und Verbreitung in allen Medien gestattet, sofern der ursprüngliche Beitrag ordnungsgemäß zitiert und nicht für kommerzielle Zwecke genutzt wird und keine Änderungen und Anpassungen vorgenommen werden.

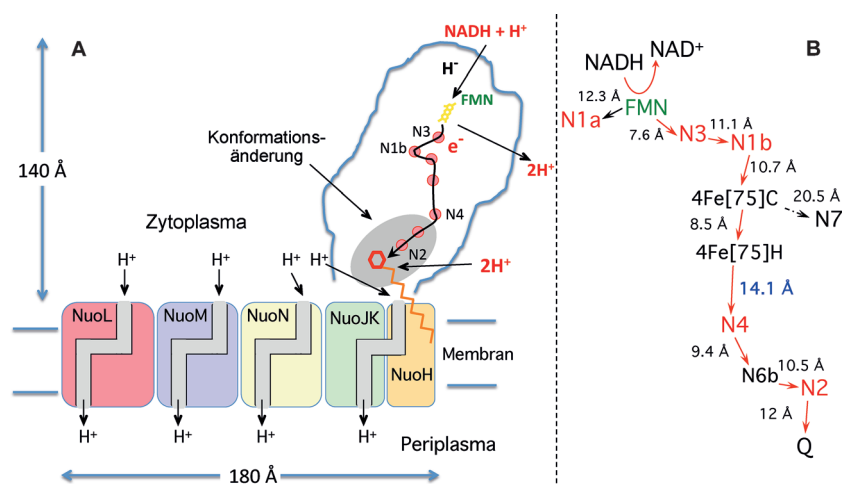


Abbildung 1. A) Prinzipieller Aufbau des Komplex I.^[3b,4c,e] Das rote Hexagon stellt die Chinon-Kopfgruppe dar, der graue Bereich den der Redox-abhängigen konformativen Änderungen. B) Abstände zwischen den Kofaktoren. Die mittels EPR-Spektroskopie nachweisbaren FeS-Zentren sind rot dargestellt. FMNH₂ reduziert N3 und FMNH* N1a. Der Abstand zwischen 4Fe[75]C und N7 ist zu groß, um die schnelle NADH-Oxidation von 150–200 s⁻¹ zu gewährleisten.^[5]

Elektronen im Komplex in Gegenwart des Inhibitors Piericidin bestimmt, der die Reduktion von endogenem Q blockiert (Abbildung S2). NADH wird sehr schnell mit einer Stöchiometrie von 3.02 ± 0.1 NADH pro Komplex I oxidiert. Die EPR-Spektroskopie dieser Probe zeigt die in etwa gleiche Verteilung von vier Elektronen über die Zentren N1a (0.95 ± 0.05), N1b (1.0 ± 0.05), N2 (0.98 ± 0.1) und N4 (0.90 ± 0.1). N3 wird bestenfalls zu 0.15 ± 0.1 reduziert. Damit werden die EPR-spektroskopisch nachweisbaren Zentren mit NADH reduziert. Die übrigen Zentren (Abbildung 1) verbleiben

oxidiert, im Einklang mit Untersuchungen mittels Mößbauer-Spektroskopie.^[12] Der Komplex I ist somit nach drei konsekutiven Umsätzen von NADH vollständig reduziert.

UV/Vis-Spektren des NADH-reduzierten Komplexes in Gegenwart (Abbildung 2) oder Abwesenheit von Piericidin (Abbildung S3) zeigen die Absorbanz des FMN bei 448 nm. Unabhängig von der Anwesenheit des Piericidins und bei einer NADH-Konzentration von sowohl 2 als auch 100 mM wird der Gipfel bei 448 nm innerhalb der ersten 97 μ s gebleicht, was einer 85 %igen Reduktion des Flavins entspricht. Das FMN bleibt während der gesamten Reaktion reduziert. Die EPR-Spektren der Proben nach 198 μ s Reaktionszeit zeigen, dass die FeS-Zentren etwa 100 μ s nach dem FMN reduziert werden (Abbildungen 2, S4). Ohne Piericidin werden die FeS-Zentren erst nach 300–400 μ s reduziert, da die Elektronen zuerst auf das Chinon übertragen werden (Abbildung S3).

Die „Freeze-Quench“-Methode produziert geringe und variable Anteile von Radikalen in der Probe (Spur $t = 0$ (Ox), Abbildungen 2, S3).^[11a] Der maximale Anteil der FMN- und Q-Radikale wurde zu $< 0.04/\text{Komplex}$ bestimmt, was im Einklang mit ihren geringen Stabilitätskonstanten (K_{stab}) ist.^[13] Die mehrphasische Reduktion der FeS-Zentren ist von den drei NADH-Umsätzen (Abbildung 3, S5) und den thermodynamischen Eigenschaften der Kofaktoren (E_m) geprägt. Die experimentellen Daten (Abbildung 3, S5) wurden

anhand des vollständigen Reaktionsschemas (Abbildung 4) unter Berücksichtigung der kinetischen und thermodynamischen Parameter simuliert, die in Tabelle 1 aufgelistet sind. Die E_m -Werte der Zentren wurden anhand des E_m des Flavins und seines K_{stab} berechnet (Hintergrundinformationen). Die Simulation trägt der Lebensdauer der Reduktion des Flavins, der Verzögerungsphase von 100 μ s und überraschenderweise zwei Halbwertszeiten von 200 und 1200 μ s für den langsamsten Elektronentunnelschritt Rechnung (Tabelle 1).

Der Reduktion des FMN zu FMNH₂ durch das erste NADH folgt eine Verzögerungsphase von 100 μ s. Die darauffolgende Oxidation des FMNH₂ zu FMNH* führt zu einer partiellen Reduktion von N1b, N4 und N2 entsprechend ihrer E_m -Werte mit einer Halbwertszeit von $t_{1/2} = 200 \mu$ s (Abbildungen 2–4). Die schnelle Reduktion von N2 ist im Einklang mit seinem hohen Mittelpunktspotential (Tabelle 1), die von N1a (Abbildungen 2 und 3) ist überraschend, da N1a das niedrigste E_m aller Zentren aufweist (Tabelle 1). Die schnelle Reduktion von N1a

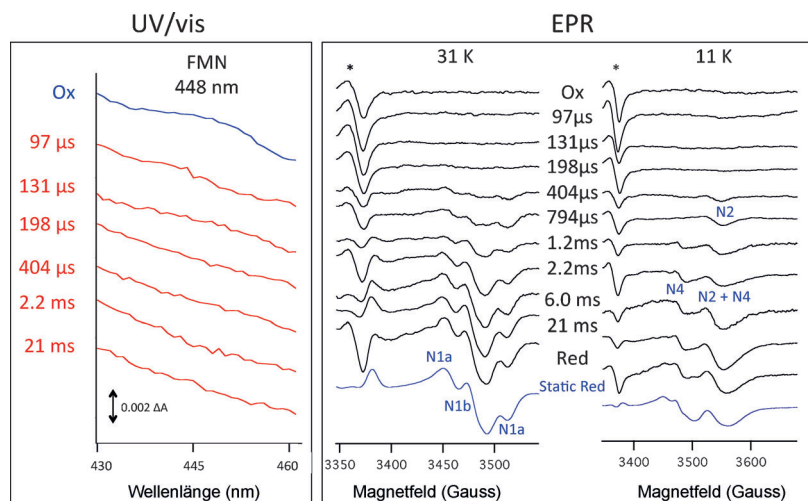


Abbildung 2. Tieftemperatur-UV/Vis-Spektren im Bereich der Absorption des FMN (links) und EPR-Spektren (rechts) des Komplex I von Proben, die in Gegenwart von Piericidin mit 100 mM NADH versetzt und zu den angegebenen Zeiten eingefroren wurden. Die EPR-Spektren zeigen den g_x, g_y -Bereich der Absorptionen der FeS-Zentren. Der variable Anteil von Radikalen, die durch die „Freeze-Quench“-Methode erzeugt werden, sind durch die Sternchen im Bereich von $g = 2$ gekennzeichnet. Static red: NADH-reduzierte und manuell eingefrorene Probe. Bei 31 K sind die Signale der Zentren N1a und N1b, bei 11 K zusätzlich die der Zentren N2 und N4 zu sehen.

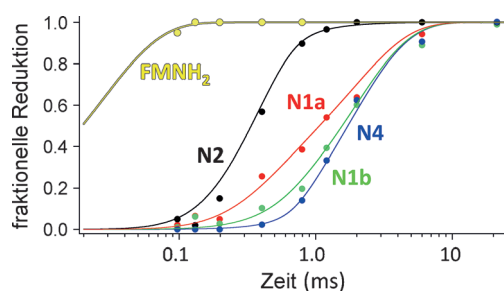


Abbildung 3. Kinetik des FMN und der FeS-Zentren in Gegenwart von Piericidin. Die Linien zeigen die Simulationen basierend auf dem kinetischen Schema (siehe Haupttext) und den in Tabelle 1 gezeigten Parametern. FMN (gelb), N2 (schwarz), N1a (rot), N1b (grün) und N4 (blau).

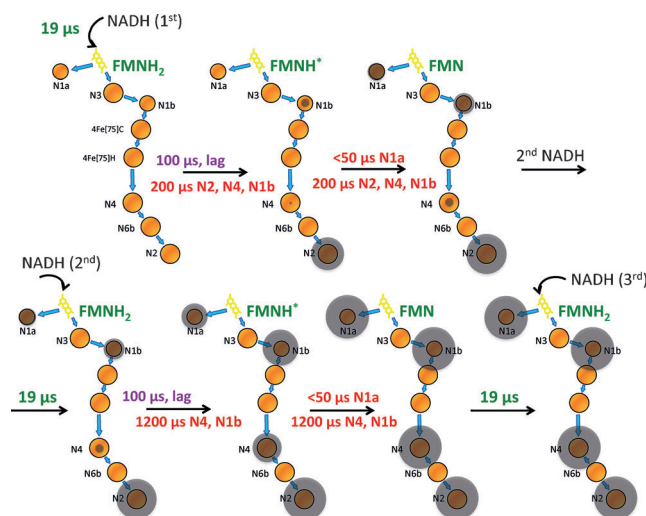


Abbildung 4. Sequentielle Reaktion des Komplex I mit drei Molekülen NADH in der Gegenwart von Piericidin. Der Umfang der grauen Kreise ist ein Maß für die Reduktion der einzelnen Zentren. Der sechsfache Unterschied der Geschwindigkeiten ($t_{1/2} = 200$ und $1200 \mu\text{s}$) hängt vom Redoxzustand von N2 ab. Bei $[\text{NADH}] = 100 \text{ mM}$ wird das FMN mit $t_{1/2} = 19 \mu\text{s}$ reduziert. Das NAD^+ dissoziiert in der $100 \mu\text{s}$ Verzögerungsphase („lag“).

wird durch ein schnelles Gleichgewicht mit dem FMN/FMNH*-Redoxpaar erklärt, das ein sehr niedriges Potential aufweist. Die Kette der Zentren zwischen FMN und Q steht dagegen im Gleichgewicht mit dem FMNH*/FMNH₂-Redoxpaar. Da N1a genauso schnell reduziert wird wie N2, N1b und N4 (Tabelle 1) muss sich das Gleichgewicht zwischen N1a und FMNH* schnell einstellen (Abbildung 4), was erklärt, warum kein stabiles FMNH*-Radikal gebildet wird (Abbildung 2, S3). Im Rahmen der experimentellen Genauigkeit und einer „Freeze-Quench“-Zeit von $50 \mu\text{s}$ ^[11] stellt sich das Gleichgewicht zwischen N1a und dem FMNH* innerhalb von $t_{1/2} < 50 \mu\text{s}$ ein (Tabelle 1). Die aus der Verteilung der Elektronen über die FeS-Zentren berechneten E_m -Werte stimmen sehr gut mit denen aus Fließgleichgewichtsmessungen^[14] überein (Tabelle 1), wenn die Gleichgewichtseinstellung von N1a mit dem FMN/FMNH*-Paar und das der übrigen Zentren mit dem FMNH*/FMNH₂-Paar zugrundegelegt wird.

Tabelle 1: Kinetische und Gleichgewichtskonstanten.^[a]

Zentrum	E_m [mV] Glgew. ^[b]	E_m [mV] simuliert ^[c]	$t_{1/2}$ obs. [μs] N2 oxidiert	$t_{1/2}$ obs. [μs] N2 reduziert
N2	−160	−159	200 ± 20	
N1a	−330	−317	200 ± 30	1200 ± 200
N1b	−230	−223	200 ± 20	1200 ± 100
N4	−270	−257	200 ± 20	1200 ± 100
FMN → FMNH ₂	−259	−259	19 ± 5 ^[d]	19 ± 5
Lag-Phase			100 ± 20	100 ± 20

	Halbwertszeiten der Elementarschritte [μs]
NADH → FMN (H ⁺ -Transfer)	19 ± 5 ^[e]
N4Fe[75]H → N4 (N2 _{ox})	$200 (\pm 20)$
N4Fe[75]H → N4 (N2 _{red})	$1200 (\pm 100)$
FMNH* → N1a	< 50
NAD ⁺ -Dissoziation	100 ± 20
(De)Protonierung von FMNH ₂ /FMNH ⁺ /FMNH*/N2	≤ 50

[a] Gilt für pH 6, 10 °C. [b] Aus potentiometrischen Titrationen.^[13] [c] Berechnet aus der Simulation der Kinetik (Abbildungen 3 und S5) mit $E_{m,\text{pH}6}$ (FMN/FMNH₂) = −259 mV und $K_{\text{stab}} = 4.5 \times 10^{-2}$.^[13b] [d] Bei $[\text{NADH}] = 100 \text{ mM}$; $t_{1/2} = 30 \mu\text{s}$ bei 2 mM NADH. [e] Mit k_{on} (NADH) = $3.1 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Vernünftige Anpassungen wurden mit den Geschwindigkeiten und den angegebenen Abweichungen ($\pm$) und den E_m -Werten bei einer Abweichung von $\pm 10 \text{ mV}$ erhalten. Alle anderen Elektronentransferschritte sind im (Sub)mikrosekunden-Bereich.

Wir erwarteten, dass die Oxidation des zweiten NADH eine ähnliche Kinetik aufweisen würde, was eine gleichmäßige Verteilung von vier Elektronen über die Zentren N2, N1a, N1b und N4 zur Folge hätte. Dabei wäre das FMN formal oxidiert (Abbildung 4), und seine schnelle Reduktion durch das dritte NADH markiert das Ende der Reaktion. Erstaunlicherweise war die Reduktion der Zentren durch das zweite NADH aber sechsfach langsamer ($t_{1/2} = 1200 \mu\text{s}$; Tabelle 1, Abbildung 3) als die durch das erste NADH. Der Zeitverlauf der Reduktion der FeS-Zentren in der Abwesenheit von Piericidin (Abbildungen S3–S5) wurde mit den gleichen kinetischen und thermodynamischen Parametern (Tabelle 1) simuliert. Die Zentren werden hier aufgrund der Verzögerungsphase ($t_{1/2} = 100 \mu\text{s}$) und der bevorzugten Reduktion des Chinons (0.41 Q/Komplex I) erst nach 300–400 μs reduziert. Das hohe Mittenpunktpotential des Chinons ($E_{m,\text{pH}6} = 150 \text{ mV}$) verhindert eine schnelle Reduktion der FeS-Zentren (Tabelle 1, Abbildung S5). Um eine sinnvolle Simulation der kinetischen Daten zu erhalten, müssen beide Elektronen, die das Chinon reduzieren, mit $t_{1/2} = 200 \mu\text{s}$ übertragen werden (Abbildungen S6, S7). Eine Simulation mit $t_{1/2} = 1200 \mu\text{s}$ für das zweite Elektron, wenn N2 also oxidiert ist, liefert eine Verzögerungsphase der Reduktion der Zentren, die mit den Daten nicht im Einklang steht (Abbildung S6).

Die Halbwertszeit $t_{1/2} = 200 \mu\text{s}$ spiegelt vermutlich den Elektronentransfer über $14.1 \text{ \AA}$ zwischen den Zentren 4Fe[75]H und N4 wider und liegt im Bereich der berechneten Halbwertszeiten.^[6–8] Dieser Wert wird nur beim ersten NADH-Umsatz beobachtet, wenn N2 oxidiert ist, und unabhängig davon ob die Chinon-Reduktion durch Piericidin ge-

hemmt wird (Abbildung 4, S7). Die Halbwertszeit dieses Elektronentransfers wird auf $t_{1/2} = 1200 \mu\text{s}$ erhöht, wenn N2 reduziert ist (Abbildung S7). Der Redoxzustand von N2 bestimmt also die Halbwertszeit des Elektronentransfers zwischen $4\text{Fe}[75]\text{H}$ und N4. Dementsprechend wird damit auch die Verzweigung am Flavin zu den Wegen $\text{FMNH}_2 \rightarrow \text{N2}$ und $\text{FMNH}^* \rightarrow \text{N1a}$ beeinflusst. Wenn N2 oxidiert ist, gelangen beide Elektronen von FMNH_2 und FMNH^* über N3 auf N2. Wenn N2 reduziert vorliegt, gelangt das erste Elektron von FMNH_2 auf N1b und N4, während das zweite von FMNH^* auf N1a und auf N1 und N4 einem Verhältnis von etwa 2:1 übertragen wird. Die Produktion reaktiver Sauerstoffspezies am Komplex I, die möglicherweise mit dem Auftreten neurodegenerativer Erkrankungen^[15] verknüpft ist, hängt vom Redoxzustand des FMN ab,^[16] der wiederum über den Redoxzustand von N2 reguliert wird.

Aus unseren Daten berechnet sich eine NADH-Bindungskonstante (k_{on}) von $3.1 \pm 0.6 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$, die in guter Übereinstimmung mit $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ -Werten ($1.5\text{--}4.0 \times 10^7 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) aus Gleichgewichtsmessungen ist.^[9,17] Daraus kann die Halbwertszeit des Hydridtransfers zu $20 \pm 5 \mu\text{s}$ abgeschätzt werden, was wiederum im Einklang mit dem kurzen Abstand von $3.2 \text{ \AA}$ zwischen dem C^{N} des Nikotinamids und dem N^5 des Isoalloxazinrings ist, die zueinander in Stapelwechselwirkung stehen.^[14a]

Die Reaktion des Komplexes mit NADH beinhaltet drei konsekutive Umsätze, die zur vollständigen Reduktion des FMN und der Zentren N2, N1a, N1b und N4 führen. NADH reduziert mittels Hydridtransfer das FMN zu FMNH^- gefolgt von einer raschen Protonierung zu FMNH_2 . Der weitere Elektronentransfer von FMNH_2 erfolgt in zwei Eielektronenübertragungen mit FMNH^* als Intermediat und einer vorgelagerten, nicht-limitierenden ($t_{1/2} < 50 \mu\text{s}$, Tabelle 1) Deprotonierung des entsprechenden Anions. Die Oxidation des FMNH_2 tritt nach einer Verzögerungsphase von $100 \mu\text{s}$ auf, die der NAD^+ -Dissoziation zugeschrieben wird. Das FMN stellt einen Verzweigungspunkt des Elektronentransfers entweder zum Q oder zu N1a dar, der vom Redoxzustand von N2 abhängt (Abbildung S7). Die Elektronen von FMNH_2 (und/oder FMNH^*) werden auf Q mit $t_{1/2} = 200 \mu\text{s}$ übertragen, wenn N2 oxidiert ist. Die Reduktion von N2, dessen Potential pH-abhängig ist,^[14] wird von einer schnellen Protonierung begleitet. Liegt N2 reduziert vor, ist der Elektronentransfer auf $t_{1/2} = 1200 \mu\text{s}$ verlangsamt. Diese sechsfach langsamere Reduktion kann nicht durch eine langsame Dissoziation des NAD^+ vor Bindung des zweiten NADH erklärt werden,^[9] da das FMN während der Reaktion reduziert vorliegt (Abbildung 2 und S3). Dies zeigt, dass die Dissoziation von NAD^+ schneller ist als der limitierende Elektronentransfer von $200 \mu\text{s}$. Wir schlagen vor, dass NAD^+ in der Verzögerungsphase vor der Reduktion der Zentren dissoziiert. Die daraus abgeschätzte Halbwertszeit von $t_{1/2} = 100 \mu\text{s}$ ist im Einklang mit einem Wert von $< 140 \mu\text{s}$, der aus Gleichgewichtsmessungen berechnet wurde.^[13a,18] In dem minimalen kinetischen Schema (Abbildung 4) wird eine schnelle Fließgleichgewichtseinstellung zwischen den Redoxzentren angenommen (Tabelle 1). Diese Annahme ist gerechtfertigt, da die meisten Elektronentransferschritte innerhalb der beiden Halbwertszeiten ($t_{1/2} = 200$ und $1200 \mu\text{s}$)

und innerhalb der experimentell auflösbaren Zeit von ca. $50 \mu\text{s}$ ^[11] stattfinden. Diese schnelle Gleichgewichtseinstellung verhindert den Nachweis kurzlebiger Intermediate, wie z. B. transient reduzierte FeS-Zentren (Abbildung 4). Radikalische Zustände des FMN und des Q akkumulieren nicht. Die Gründe liegen in ihrer geringen Stabilität und der schnellen Gleichgewichtseinstellung mit ihren jeweiligen Reaktionspartnern, N1a ($< 50 \mu\text{s}$) bzw. N2 ($\approx 0.4 \mu\text{s}$ ^[7]). Eine Konsequenz der schnellen Gleichgewichtseinstellung ist der gleiche Zeitverlauf der Reduktion aller FeS-Zentren, der durch die beiden längsten Halbwertszeiten bestimmt ist.

Die sechsfache Zunahme der Elektronentunnelrate wird durch den sechsfach langsameren Elektronentransfer zwischen den Zentren $4\text{Fe}[75]\text{H}$ und N4 (Abbildung 1) verursacht. Jeder übrige Transfer müsste um einen Faktor von > 1000 geändert werden, was zu veränderten Elektronenverteilungen über die Zentren führen würde. Eine sechsfache Änderung von k_{ET} kann nach der Marcus-Theorie^[19] erreicht werden durch: 1) eine sechsfache Änderung von V_0^2 , dem Quadrat der maximalen elektronischen Kopplung zwischen $4\text{Fe}[75]\text{H}$ und N4; 2) eine Abstandsänderung zwischen den Zentren von ca. $1.3 \text{ \AA}$; 3) eine Änderung der Reorganisationsenergie λ um ca. 0.2 eV ; oder 4) eine Änderung von ΔG^0 um ca. 0.1 eV . Aufgrund der ähnlichen Strukturen von oxidiertem und reduziertem Enzym^[4a] ist eine Abstandsänderung ebenso wenig wahrscheinlich wie eine Änderung von λ . Eine Änderung von ΔG^0 kann durch Erhöhung des E_{m} von N4 um ca. 0.1 eV erreicht werden. Allerdings nähert sich damit das Potential von N4 dem von N2 an (Tabelle 1) und würde in einer ähnlichen Reduktionskinetik für N4 und N2 resultieren, die experimentell nicht beobachtet wird (Abbildungen 2 und 3). Umgekehrt könnte das Potential von $4\text{Fe}[75]\text{H}$ erniedrigt werden, aber Rechnungen zeigen, dass dieser Effekt vernachlässigbar ist.^[20]

Der Elektronentransfer von N3 auf N1b, von $4\text{Fe}[75]\text{H}$ auf N4 und von N6b auf N2 findet zwischen verschiedenen Protein-Untereinheiten statt. Die berechneten Elektronentransfargeschwindigkeiten hängen stark von der Anwesenheit von Wassermolekülen an den Oberflächen dieser Untereinheiten ab.^[7] Wasser ist ein essentieller Mediator,^[21] der die Elektronentransfargeschwindigkeiten der oben genannten Übergänge durch Vergrößerung von V_0^2 jeweils etwa 2400-fach, 700-fach und 1000-fach erhöht.^[7] Der Elektronentransfer von $4\text{Fe}[75]\text{H}$ auf N4 könnte durch kleine strukturelle Änderungen der Struktur des Grenzflächenwassers aufgrund geringer konformativer Bewegungen des Proteins verlangsamt werden. Strukturelle Daten zeigen, dass der Elektronentransfer über N2 und Q konformative Änderungen induziert, die zu vier Protonenkanälen im Membranarm übertragen werden und so die Protonentranslokation antreiben.^[3b,4a,b,f] Die hier vorgestellten Daten legen nahe, dass die Reduktion von N2 auch konformative Änderungen induziert, die die elektronische Kopplung mindert und damit die Geschwindigkeit des Elektronentransfers von $4\text{Fe}[75]\text{H}$ auf N4 in den Millisekunden-Bereich bringt und damit mit der Protonentranslokation synchronisiert. In der Tat finden der Elektronentransfer und die Protonentranslokation auf der gleichen Zeitskala statt, wie Berechnung am *E. coli* Komplex I im physiologischen Fließgleichgewicht zeigen (Hinter-

grundinformationen). Die Synchronisierung von Elektronentransfer und Protonentranslokation ist wichtig, um die Energiedissipation zu minimieren und die mechanistische Kopplung und damit die Effektivität der Energieumwandlung zu optimieren. Die Kette der FeS-Zentren ist somit nicht einfach ein elektronenleitender Draht, sondern er moduliert zudem die Elektronentunneleraten während der Reaktion.

Um die Elektronentransfargeschwindigkeiten im Bereich von Nano- zu Millisekunden zu kontrollieren, reicht eine Kette von drei oder vier Zentren aus,^[22] wie sie z.B. in der Succinat-Dehydrogenase,^[22a] der Fumarat-Reduktase,^[22b] der Formiat-Dehydrogenase,^[22c] der Nitrat-Reduktase,^[22d] der Hydrogenase^[22e] und der Nitrogenase^[22f] vorkommt. Hier ist der Elektronentransfer jeweils mit einer Protonierungsreaktion gekoppelt, und die Geschwindigkeiten dieser Prozesse müssen gut aufeinander abgestimmt sein, um die Bildung energetisch unvorteilhafter Intermediate zu verhindern, die die Katalyse verlangsamen könnten, oder die zur Bildung ungewünschter reaktiver Intermediate betragen könnten. Eine geeignete Taktung wird durch eine „Redox-Feinabstimmung“ erzeugt, bei der das Mittenpunktpotential eines zentralen FeS-Zentrums der Kette erniedrigt wird, um so die Elektronentransfargeschwindigkeit in den Millisekunden-Bereich zu verlangsamen.^[6] Es wurde vorgeschlagen, dass dieser Mechanismus dazu beiträgt, die Bildung toxischer Singulett-Sauerstoffspezies in der Photosynthese zu verhindern.^[23] Lange Redoxketten sind die strukturelle und die Marcus-Theorie die theoretische Basis, mit der die Natur durch Anwendung einfacher biophysikalischer Prinzipien Elektronentransfargeschwindigkeiten über die Variation von Entfernung, Triebkraft und elektronischer Kopplung innerhalb eines weiten Bereichs einzustellen vermag und so einen effizienten und spezifischen Energiewandler, den Atmungsketten-Komplex I, evolviert hat.

Eingegangen am 17. November 2014

Online veröffentlicht am 19. Januar 2015

Stichwörter: Bioenergetik · Elektronentunneln · Enzymkinetik · Metalloenzyme · Reaktionsmechanismen

- [1] a) U. Brandt, *Annu. Rev. Biochem.* **2006**, *75*, 69–92; b) T. Friedrich, *J. Bioenerg. Biomembr.* **2014**, *46*, 255–268; c) J. Hirst, *Biochem. J.* **2010**, *425*, 327–339; d) L. A. Sazanov, *Biochemistry* **2007**, *46*, 2275–2288.
- [2] a) T. Ohnishi, E. Nakamaru-Ogiso, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2008**, *1777*, 703–710; b) M. M. Roessler, M. S. King, A. J. Robinson, F. A. Armstrong, J. Harmer, J. Hirst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 1930–1935.
- [3] a) M. A. Tocilescu, V. Zickermann, K. Zwicker, U. Brandt, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2010**, *1797*, 1883–1890; b) R. Baradaran, J. M. Berrisford, G. S. Minhas, L. A. Sazanov, *Nature* **2013**, *494*, 443–448.

- [4] a) J. M. Berrisford, L. A. Sazanov, *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 29773–29783; b) S. Dröse, S. Krack, L. Sokolova, K. Zwicker, H. D. Barth, N. Morgner, H. Heide, M. Steger, E. Nubel, V. Zickermann, S. Kerscher, B. Brutschy, M. Radermacher, U. Brandt, *PLoS Biol.* **2011**, *9*, e1001128; c) R. G. Efremov, R. Baradaran, L. A. Sazanov, *Nature* **2010**, *465*, 441–445; d) R. G. Efremov, L. A. Sazanov, *Nature* **2011**, *476*, 414–420; e) L. A. Sazanov, P. Hinchliffe, *Science* **2006**, *311*, 1430–1436; f) S. Steimle, C. Bajzath, K. Dorner, M. Schulte, V. Bothe, T. Friedrich, *Biochemistry* **2011**, *50*, 3386–3393.
- [5] S. Stolpe, T. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2004**, *279*, 18377–18383.
- [6] C. C. Moser, T. A. Farid, S. E. Chobot, P. L. Dutton, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2006**, *1757*, 1096–1109.
- [7] T. Hayashi, A. A. Stuchebrukhov, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2010**, *107*, 19157–19162.
- [8] C. Wittekindt, M. Schwarz, T. Friedrich, T. Koslowski, *J. Am. Chem. Soc.* **2009**, *131*, 8134–8140.
- [9] M. L. Verkhovskaya, N. Belevich, L. Euro, M. Wikstrom, M. I. Verkhovsky, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2008**, *105*, 3763–3767.
- [10] T. Pohl, M. Uhlmann, M. Kaufenstein, T. Friedrich, *Biochemistry* **2007**, *46*, 10694–10702.
- [11] a) A. V. Cherepanov, S. de Vries, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2004**, *1656*, 1–31; b) S. de Vries in *Application of Physical Methods to Inorganic and Bioinorganic Chemistry* (Hrsg.: R. A. Scott, C. M. Lukehart), Wiley, Chichester, **2007**, S. 125–142.
- [12] H. R. Bridges, E. Bill, J. Hirst, *Biochemistry* **2012**, *51*, 149–158.
- [13] a) J. A. Birrell, G. Yakovlev, J. Hirst, *Biochemistry* **2009**, *48*, 12005–12013; b) V. D. Sled, N. I. Rudnitsky, Y. Hatefi, T. Ohnishi, *Biochemistry* **1994**, *33*, 10069–10075.
- [14] H. Leif, V. D. Sled, T. Ohnishi, H. Weiss, T. Friedrich, *Eur. J. Biochem.* **1995**, *230*, 538–548.
- [15] R. S. Balaban, S. Nemoto, T. Finkel, *Cell* **2005**, *120*, 483–495.
- [16] a) L. Kussmaul, J. Hirst, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 7607–7612; b) T. Ohnishi, *Nature* **2010**, *465*, 428–429.
- [17] K. Morina, M. Schulte, F. Hubrich, K. Dorner, S. Steimle, S. Stolpe, T. Friedrich, *J. Biol. Chem.* **2011**, *286*, 34627–34634.
- [18] A. D. Vinogradov, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2008**, *1777*, 729–734.
- [19] a) R. A. Marcus, N. Sutin, *Biochim. Biophys. Acta Rev. Bioenerg.* **1985**, *811*, 265–322; b) C. C. Moser, J. M. Keske, K. Warncke, R. S. Farid, P. L. Dutton, *Nature* **1992**, *355*, 796–802.
- [20] V. A. Couch, E. S. Medvedev, A. A. Stuchebrukhov, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.* **2009**, *1787*, 1266–1271.
- [21] J. Lin, I. A. Balabin, D. N. Beratan, *Science* **2005**, *310*, 1311–1313.
- [22] a) V. Yankovskaya, R. Horsefield, S. Tornroth, C. Luna-Chavez, H. Miyoshi, C. Leger, B. Byrne, G. Cecchini, S. Iwata, *Science* **2003**, *299*, 700–704; b) T. M. Iverson, C. Luna-Chavez, G. Cecchini, D. C. Rees, *Science* **1999**, *284*, 1961–1966; c) J. C. Boyington, V. N. Gladyshev, S. V. Khangulov, T. C. Stadtman, P. D. Sun, *Science* **1997**, *275*, 1305–1308; d) M. G. Bertero, R. A. Rothery, M. Palak, C. Hou, D. Lim, F. Blasco, J. H. Weiner, N. C. Strynadka, *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 681–687; e) A. Volbeda, M. H. Charon, C. Piras, E. C. Hatchikian, M. Frey, J. C. Fontecilla-Camps, *Nature* **1995**, *373*, 580–587; f) H. Schindelin, C. Kisker, J. L. Schlessman, J. B. Howard, D. C. Rees, *Nature* **1997**, *387*, 370–376.
- [23] A. W. Rutherford, A. Osyczka, F. Rappaport, *FEBS Lett.* **2012**, *586*, 603–616.