

BERND LUDWIG, INSTITUT FÜR BIOCHEMIE

Elektronentransfer und Protonentranslokation: Struktur und Funktion von bakteriellen Atmungskettenkomplexen

Die Arbeitsgruppe untersucht die Mechanismen der Energieumwandlung in der zellulären Atmungskette. Bei diesem Vorgang werden Elektronen kaskadenförmig in mehreren Stufen über membranintegrale Proteinkomplexe weitergegeben und letztendlich auf Sauerstoff übertragen. Die freie Energie, die aus diesem Reaktionsweg resultiert, wird vorübergehend in einem Protonengradienten gespeichert, der dann die Synthese von ATP, der generellen Energiewährung der Zelle, antreibt. Als Modellorganismen dienen dazu verschiedene Bakterien (Richter und Ludwig), die sowohl in ihrem genetischen Hintergrund als auch in der Untereinheiten-Struktur ihrer entsprechenden Redoxenzyme

wesentlich einfacher aufgebaute Systeme darstellen als die weitaus komplexeren Mitochondrien einer höheren Zelle. Ein Schwerpunkt der Untersuchungen sind die terminalen Oxidasen; die 3-dimensionale Struktur mehrerer Vertreter dieser membranintegralen Proteinkomplexe ist bekannt (Fig. 1 und 2), wesentliche Details ihrer Funktion im Elektronentransfer und als gekoppelte Protonenpumpen sind jedoch noch nicht verstanden. So richtet sich unser Augenmerk auf die Frage der Wechselwirkung mit dem Elektronendonator Cytochrom c, der Beteiligung radikalischer Zwischenstufen im Reaktionszyklus (Fig. 3; Wiertz et al.) und auf den Mechanismus der Kopplung des internen Elektronentransports an die Protonentranslokation über die Membran (Fig. 4; Dürr et al.). Wie schon für Mitochondrien beschrieben, sind auch bakterielle Atmungsketten vielfach als supramolekulare Oligomere (Morgner et al.) oder als Assoziate funktionell interagierender Redoxkomplexe in der Membran organisiert.

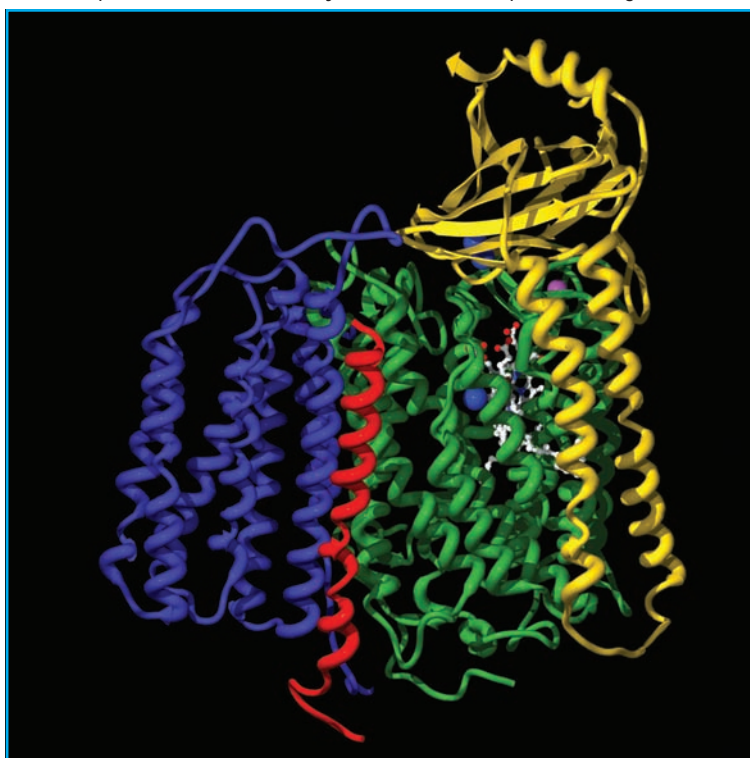


Abbildung 1: Raumstruktur der Cytochrom c Oxidase aus *Paracoccus denitrificans*.

Die vier Protein-Untereinheiten (UE I-IV) des Komplexes sind in grün, gelb, blau und rot dargestellt, die redox-aktiven Zentren werden von UE I (Häm a, Häm a₃ und Cu_B, blaue Kugel) und von UE II (Cu_A, zwei blaue Kugeln) ligandiert. Proteinkontakte mit der nativen Phospholipidmembran erfolgen im Bereich der Helixelemente.

BERND LUDWIG, INSTITUTE OF BIOCHEMISTRY

Electron Transfer and Proton Translocation: Structure and Function of Bacterial Respiratory Chain Complexes

We address the mechanisms of energy transduction in the respiratory chain of cells where electrons are transferred in a stepwise manner by membrane-integral protein complexes to eventually reduce di-oxygen to water. The free energy of this cascade reaction is transiently stored in a proton gradient to finally fuel the synthesis of ATP, the general energy „currency“ of all cells. Several bacteria are used as model organisms (Richter and Ludwig), as they typically exhibit a much simpler organisation in their genetic background, and a simpler subunit structure of their redox enzymes, when compared to their far more complex mitochondrial counterparts in a higher cell.

Our main focus is the family of terminal oxidases; while the 3-dimensional structures of several family members are known (see Fig. 1 and 2), essential molecular features of their reaction cycle and of coupled proton translocation still remain elusive. We specifically target their role in cytochrome c interaction, the participation of a radical intermediate state during internal electron transfer (Fig. 3; and Wiertz et al.), and the mechanism of the transmembrane proton pump (Fig. 4; and Dürr et al.). As recently discovered for the mitochondrial complexes, also bacterial respiratory complexes are organized in supramolecular oligomers (Morgner et al.) and in supercomplexes consisting of different functionally interacting enzymes in the membrane.

Bacterial systems make ideal study objects also in the area of biosynthesis, in particular for addressing the insertion of metal centers into oxidase, such as the loading of copper ions and heme moieties into subunits I and II (Fig. 2). In this respect we have recently unra-



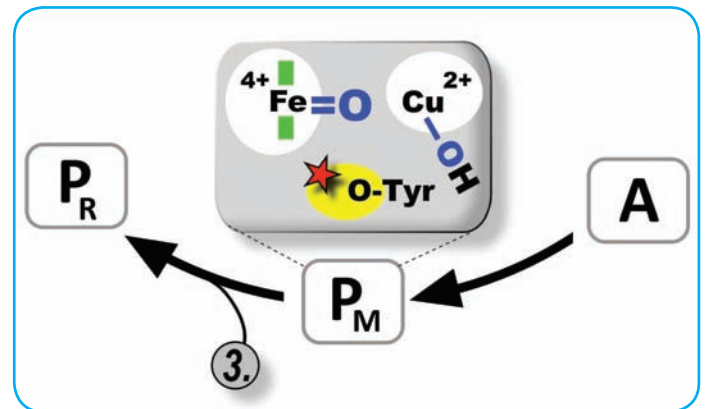
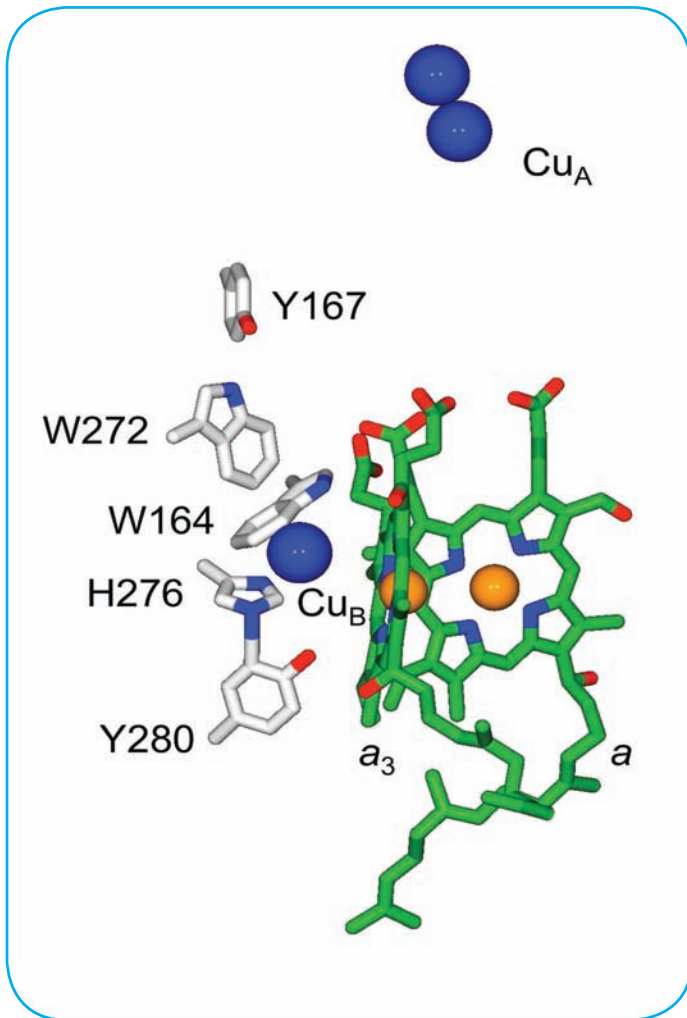


Abbildung 3: Ausschnitt aus dem Sauerstoff-Reaktionszyklus der Oxidase
Schematischer Blick auf das binukleäre Zentrum in UE I (siehe Fig. 2) und die beiden blauen Sauerstoff-Atome unmittelbar nach Spaltung der O=O Bindung (Zustand P_M). Als Intermediat wird hier ein Radikalzustand (*) eines benachbarten Tyrosinrests angenommen.

Figure.3: Central aspect of the oxygen reaction cycle of oxidase
Schematic view into the binuclear center in SU I (see Fig. 2) and the two oxygen atoms (in blue) immediately after O=O bond splitting (state P_M). At this point, a radical state intermediate of a neighbouring tyrosine residue is assumed.

Abbildung 2: Anordnung der Redoxzentren in der Cytochrom c Oxidase aus *P. denitrificans*.

Redoxzentren (siehe Fig. 1) und wichtige Aminosäure-Reste in der Umgebung des binukleären Zentrums der UE I, Häm a₃ • Cu_B, an dem die Reduktion des Sauerstoffs stattfindet.

Figure.2: Arrangement of redox centers in cytochrome c oxidase from *P. denitrificans*.
Redox centers (see also Fig. 1) and important amino acid residues in the vicinity of the binuclear center of SU I, heme a₃ • Cu_B, where di-oxygen is reduced to water.

Bakterielle Systeme eignen sich ebenso auch für Untersuchungen zur Frage, wie während der Biogenese des Proteinkomplexes die verschiedenen Metallzentren in Untereinheit I und II eingebaut werden (Fig. 2). Hier konnte insbesondere die Rolle eines Chaperons geklärt werden, das für die Insertion der Hämgruppen verantwortlich ist und bei Fehlfunktion im Menschen zu einer schweren neurodegenerativen Erkrankung führt (Bundschuh et al.).

Einen weiteren Forschungsaspekt stellt der Cytochrom bc₁ Komplex dar, dessen Untereinheiten in verschiedenen Bakterien analysiert (siehe Fig. 5) und die Interaktion mit seinen c-Typ Substraten sowie die funktionelle Wechselwirkung zwischen den Monomeren im Dimerkomplex charakterisiert werden.

Als Untersuchungsmethoden setzen wir die Analyse der Genorganisation, die gezielte Mutagenese sowie eine Reihe biochemischer und biophysikalischer Charakterisierung der isolierten Proteinkomplexe ein.

(Förderung durch die Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 472 und CEF-MC, Cluster of Excellence Frankfurt, „Macromolecular Complexes“)

velled the role of a chaperone in heme a delivery to oxidase (Bundschuh et al.): in humans, its loss elicits a severe neurological defect. A further aspect of our research deals with *cytochrome bc*₁ complexes in bacteria, their subunit analysis (see Fig. 5) and interactions both with their cytochrome c substrates and their functional cross-talk between monomers in higher oligomeric associations.

In our group we apply a number of techniques to analyze the organization of the relevant genes, make extensive use of site-directed mutagenesis, and characterize isolated membrane protein complexes by a variety of biochemical and biophysical methods.

(supported by Deutsche Forschungsgemeinschaft (SFB 472 and CEF-MC, Cluster of Excellence Frankfurt, „Macromolecular Complexes“)

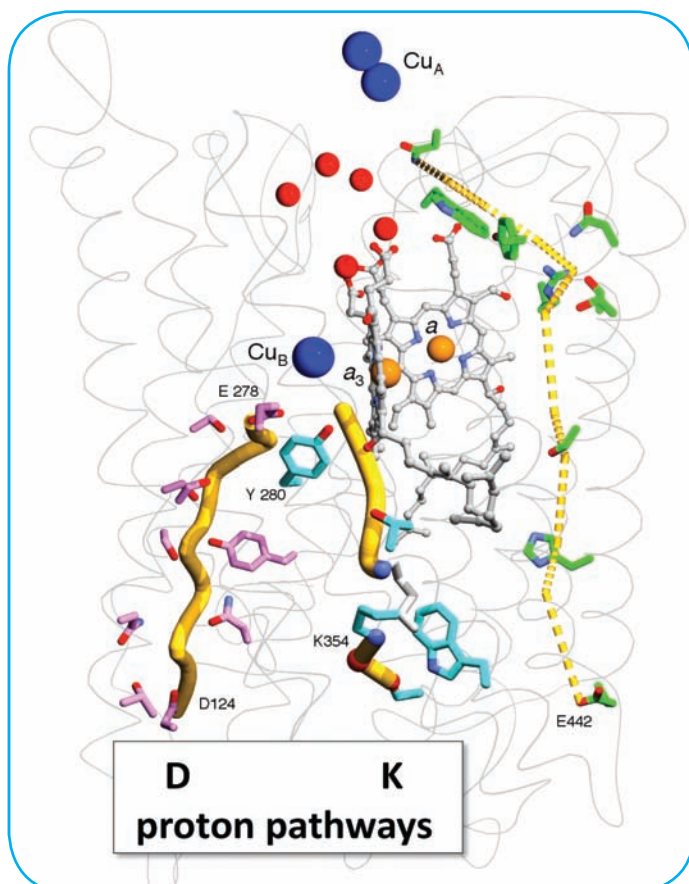


Abbildung 4: Protonenpfade in UE I der Oxidase

Schematische Darstellung der Oxidase, vgl. Fig. 1. Die gelben Kanäle heben die beiden kanonischen Wegstrecken („D und K pathway“) hervor, die für Protonen zur Wasserbildung am binukleären Zentrum oder für die transmembranen Pumpschritte genutzt werden und entweder funktionell durch Mutagenese-Experimente charakterisiert oder aus der Struktur abgeleitet wurden.

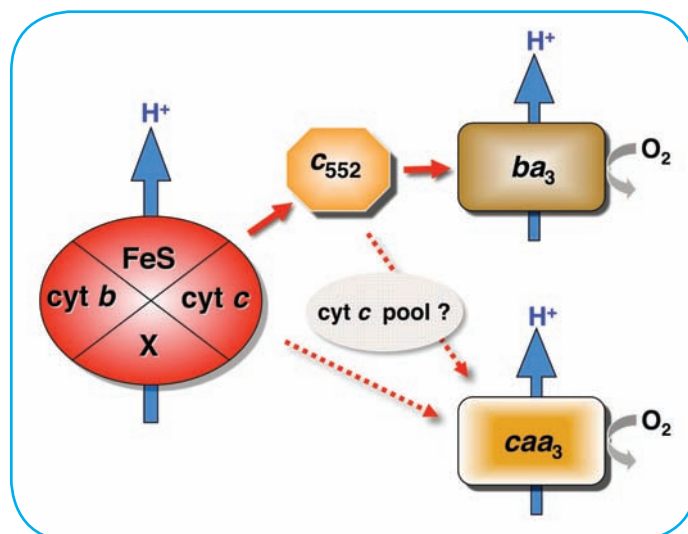


Abbildung 5: Funktionelle Integration eines neu charakterisierten bc-Komplexes in die Elektronentransport-Kette von *Thermus thermophilus*

Der Menachinon-tragende Cytochrom bc-Komplex mit seinen vier UE (rot) stellt Elektronen für den terminalen Teil der Redoxkette zur Verfügung, für den zwei Oxidasen beschrieben sind (ba_3 und caa_3). Blaue Pfeile weisen auf die protonentranslozierenden Eigenschaften der Redoxkomplexe hin.

Figure.5: Functional integration of a newly discovered bc complex into the electron transfer chain of *Thermus thermophilus*

The menaquinone-based cytochrome bc complex with its four SU feeds electrons into the terminal part of the respiratory chain with its two known oxidases. Blue arrows denote enzyme complexes with energy-transducing capabilities.

Figure.4: Protonic pathways in subunit I of oxidase

Schematic arrangement of oxidase, as in Fig. 1. The solid yellow channels represent the two canonical pathways (D and K) used for protons to either reach the binuclear center for water formation, or being translocated all across the membrane; data obtained from mutagenesis studies or derived from 3-D structure.

LITERATUR / REFERENCES

1. Oliver-Matthias H. Richter and BERND LUDWIG (2009) Electron transfer and energy transduction in the terminal part of the respiratory chain – lessons from bacterial model systems. **BIOCHIM. BIOPHYS. ACTA**, 1787, 625-633
2. Frank G.M. Wiertz, Oliver-Matthias H. Richter, BERND LUDWIG, and Simon de Vries (2007) Kinetic resolution of a tryptophan-radical intermediate in the reaction of *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase. **J. BIOL. CHEM.** 282, 31580-31591
3. Katharina Dürr, Jürgen Köpke, Petra Hellwig, Hannelore Müller, Heike Angerer, Guohong Peng, Elena Olkova, Oliver-Matthias Richter, BERND LUDWIG, and Hartmut Michel (2008) A D-pathway mutation decouples the *Paracoccus denitrificans* cytochrome c oxidase by altering the side chain orientation of a distant, conserved glutamate. **J. MOL. BIOL.** 384, 865-877 (2008)
4. Nina Morgner, Thomas Kleinschroth, Hans-Dieter Barth, BERND LUDWIG, and Bernhard Brutschy (2007) A novel approach to analyze membrane proteins by laser mass spectrometry: from protein subunits to the integral complex. **J. AM. SOC. MASS SPECTROM.** 8, 1429-1438
5. Freya A. Bundschuh, Achim Hannappel, Oliver Anderka, and BERND LUDWIG (2009) Surf1, associated with Leigh Syndrom in humans, is a heme-binding protein in bacterial oxidase biogenesis, **J. Biol. Chem.**, in press

KONTAKT / CONTACT: Fachbereich Biochemie,
Chemie und Pharmazie
Prof. Dr. Bernd Ludwig Institut für Biochemie

Max-von-Laue-Str. 9
D-60438 Frankfurt am Main

Tel: ++49 (0)69 798-29237, Fax: ++49 (0)69 798-29244
Email: ludwig@em.uni-frankfurt.de
<http://www.biochem.uni-frankfurt.de/>

