领域前沿・中国



杨茂君,清华大学生命科学学院教授、博士生导师,先后在吉林大学和中 国协和医科大学获得学士和博士学位,之后进入美国西南医学研究中心 从事博士后研究工作,2008年引进回国,进入清华大学任教。2016年入选 教育部"长江学者"特聘教授,获"国家杰出青年基金"资助,2017年担任科 技部重点研发计划"超大蛋白质机器的结构生物学研究"首席科学家。自 加入清华大学以来,杨茂君教授紧紧围绕细胞能量代谢系统这一领域开 展研究,特别是在线粒体呼吸链及呼吸链超级复合物的结构、功能及药 物前体分子开发等方面取得了一系列重大原创性成果。杨茂君教授研究 组首次报道了II-型呼吸链复合物I的结构(Feng et al, Nature, 2012);解析了 目前为止世界上所解析的最复杂的猪源及人源膜蛋白--线粒体超级及超超 级复合物的结构等,为进一步理解哺乳动物及人类呼吸链超级复合物的 组织形式、分子机理以及治疗细胞呼吸相关的疾病提供了重要的结构基 础(Gu et al, Nature, 2016; Wu et al, Cell, 2016; Guo et al, Cell, 2017)。杨茂 君教授先后发表SCI论文54篇,其中在国际顶级期刊Nature(2012、2015、 2016)、Cell(2016、2017)等杂志发表通讯作者论文26篇。

线粒体呼吸链超超级复合物——能量 大分子机器的终极形态

谷金科 宗 帅 吴 萌 郭润域 杨茂君* (清华大学生命科学学院,教育部蛋白质重点实验室,清华北大生命联合中心, 北京结构生物学高精尖创新中心,北京 100084)

摘要 呼吸作用是生物体最基本最重要的生命活动。在哺乳动物中,呼吸作用(氧化磷酸化) 由位于线粒体内膜上的呼吸链复合物完成。一百多年来,科学家们孜孜不倦地对线粒体呼吸链复 合物进行研究,想要窥探这一能量大分子机器的全貌,但是一直未能获取该复合物蛋白质结构。我 们最新的研究首次纯化出了来源于人类细胞的线粒体呼吸链超超级复合物I₂III₂IV₂,通过冷冻电镜 技术首次成功解析了它的结构,并且提出呼吸链复合物I、II、III和IV可以一起组成超大型复合物 I₂II₂III₂IV₂,这是呼吸链超超级复合物的终极形态。同时,我们所解析的人源呼吸链超级复合物的 高分辨率结构,为攻克线粒体缺陷引起的阿尔兹海默综合征、帕金森综合征、多发性硬化、少年 脊髓型共济失调以及肌萎缩性脊髓侧索硬化症等多种疾病打下了坚实的基础。

关键词 线粒体;呼吸链;超级复合物;冷冻电镜结构;分子机器

*通讯作者。Tel: 010-62792606, E-mail: maojunyang@tsinghua.edu.cn

国家蛋白质重大研究计划(批准号: 2017YFA0504600、2016YFA0501100)、国家自然科学基金委杰出青年基金(批准号: 31625008)、国家自然科学基金 重点项目(批准号: 21532004)和国家自然科学基金面上项目(批准号: 31570733)资助的课题

This work was supported by Funds from the National Key R&D Program of China (Grant No.2017YFA0504600, 2016YFA0501100), the National Natural Science Fund for Distinguished Young Scholars (Grant No.31625008) and the National Natural Science Foundation of China (Grant No.21532004, 31570733) *Corresponding author. Tel: +86-10-62792606, E-mail: maojunyang@tsinghua.edu.cn

网络出版时间: 2018-04-16 11:59:00 URL: http://kns.enki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180416.1158.018.html

Mitochondrial Respiratory Chain Megacomplex: the Final Assembly

Gu Jinke, Zong Shuai, Wu Meng, Guo Runyu, Yang Maojun*

(Ministry of Education Key Laboratory of Protein Science, Tsinghua-Peking Joint Center for Life Sciences, Beijing Advanced Innovation Center for Structural Biology, School of Life Sciences, Tsinghua University, Beijing 100084, China)

Abstract Respiration is one of the most vital and basic features of living organism. In mammals, respiration is accomplished by respiratory chain complexes located on mitochondrial inner membrane. In the past century, scientists have put tremendous efforts in understanding these complexes, but failed to solve the high resolution structure until recently. This year, our latest work purified megacomplex $I_2III_2IV_2$ from cultured human cells for the first time around the world, and solved its sturcture using cryo-EM single particle analysis. Besides, with the help of computer stimulation, we propose complex II is also involved in the megacomplex, which lead to the ultimate form $I_2II_2III_2IV_2$. Definitely, our high resolution megacomplex structure will provide precious information for conquering the mitochondrial malfunction diseases, including Alzheimer's syndrome, Parkinson's disease, multiple sclerosis, friedreich's ataxia, Amyotrophic lateral sclerosis, etc.

Keywords mitochondria; respiratory chain; supercomplex; cryo-EM; protein machine

1 线粒体呼吸链的研究背景

线粒体几乎参与了细胞内所有的生命活动,包 括呼吸作用、细胞分裂、细胞衰老、细胞凋亡、甚 至癌症发生等,但其中最为重要的则是呼吸作用。 呼吸作用是生物体内最基础的能量代谢活动,由位 于线粒体内膜上的四种呼吸链蛋白复合物分步完 成,这四种蛋白复合物分别为复合物I(NADH脱氢 酶)、复合物II(琥珀酸脱氢酶)、复合物III(细胞色素 c还原酶)和复合物IV(细胞色素c氧化酶)[1-2]。以这 些复合物为基础,可以聚合形成多层次的呼吸链超 级复合物乃至超超级复合物,从而获得更高的稳定 性和更高的能量转换效率。对线粒体呼吸链的研究 至今已有100多年的历史,包括其组成成分、组织 形式、组装过程、电子传递机制、能量转换方式、 致病机理等方方面面。20世纪初,科学家基本鉴定 出线粒体呼吸链上所有进行电子传递的辅基,并且 确定了这些辅基在呼吸链上的排列顺序,它们包括: NADH、FAD、FMN、Fe-S中心、泛醌、Cu中心以 及细胞色素a、a₃、b_H、b_L、c、c₁。到20世纪60年代, 科学家们确定呼吸链由五种大分子蛋白复合物机器 组成,每一种复合物执行呼吸作用的一部分过程[3]。 1961年, Peter Mitchell提出了化学渗透假说, 预测了 四种蛋白质复合物在传递电子的过程中会将质子由 线粒体基质泵入线粒体膜间隙,这个过程中所形成 的质子电化学梯度导致质子回流驱动复合物V(ATP 合成酶)合成高能分子ATP^[4]。后续的一系列实验逐步证实了这一假说,其中最为重要的是1994年John Walker解析牛源ATP合成酶的晶体结构,其利用质子回流产生的能量使头部旋转以合成ATP的机制与化学渗透假说相吻合^[5]。

随着X射线晶体学的发展,哺乳动物复合物II~IV 的晶体结构相继被解析。1995年到2003年,从原核 生物到哺乳动物复合物IV(complex IV, CIV)的完整结 构被逐步确定, CIV的功能机理也逐渐清晰^[6-7]。1997 年到2002年,单独的复合物III与结合了各类抑制 剂的复合物III的晶体结构相继被解析,多种关于 复合物III功能机理的模型也相继出现^[8]。2003年, Yankovskaya等¹⁹解析了原核生物复合物II的晶体结 构。2005年,我国著名结构生物学家饶子和实验室[10] 解析了首个猪心来源的线粒体复合物II的高分辨率 晶体结构,阐明了复合物II中电子传递的通路。2006 年到2013年, Sazanov等^[11]逐步解析了原核生物中复 合物I的完整晶体结构,揭示了复合物I传递电子和 转运质子的核心功能。但是,与功能相对简单、只 有14个核心蛋白亚基的原核生物复合物I相比,哺乳 动物的复合物I含有44种蛋白、45个亚基,难以纯化、 结晶。2014年, Hirst等^[11]通过冷冻电镜的方法首次 解析了5埃哺乳动物复合物I的中等分辨率的结构, 让我们首次看到了哺乳动物复合物I的完整构象。 我们研究组2016年以猪心为实验原材料,终于成功 获得了目前为止哺乳动物复合物I分辨率最高的近 原子分辨率的完整电镜结构^[12]。此外,我们实验室 还在2012年首次报道了酵母来源的II-型复合物I高 分辨率晶体结构并验证了其电子传递机制^[13-14]。此 外,在解析的疟原虫NDH-2的结构基础上设计、开 发了一种可以在体内外有效杀死耐药性疟原虫的药 物前体分子^[15],为开发新一代的抗疟药物打下了良 好的基础。

根据这些已经解析的呼吸链复合物的结构,科 学家们预测了电子传递的通路以及质子转运的机 制,其中一些理论已经被后续生化实验所证实,但仍 有一些理论存在争议。另外,由于当时认知水平的 局限性,大多数理论都在描述单独的呼吸链复合物 的功能机制,这并不符合生物体内的实际情况。随 着实验证据的不断发现,呼吸链超级复合物的存在 逐步得到科学家们的认可^[16]。

2 线粒体呼吸链的层级组织形式

2000年, Schägger等^[17]抽提牛心来源的线粒体 上的膜蛋白, 通过BN-PAGE这一新型电泳手段检 测到了复合物I~IV更高级的组合形式,即超级复合 物。后续的实验发现,线粒体内几乎全部的复合物 I、大部分的复合物III(超过60%)以及15%~20%的 复合物IV是存在于超级复合物中的。在超级复合 物中,复合物单体的数量可以发生变化,以形成不 同组合形式的超级复合物。由于物种来源的不同, 超级复合物的组成形式差异也很大。比如,酵母中 最主要的形式为III₂IV₁,土豆微管组织中的存在有 I₁III₂, 牛心中主要是I₁III₂IV₁, 而小鼠肝脏中则存在 I₁II₁III₂IV₁。甚至在同一个物种中,正常的生理条件 下也同样存在不同组成形式的超级复合物。高等哺 乳动物中,最为常见的组成形式为I₁III₂IV₁,即呼吸 体(respirasome)^[17]。而我们近年来的实验逐步证明, 以上这些实验结果并不可靠,极有可能是因为实验 操作人员所用抽提溶液不对导致的线粒体复合物被 人为地打开了。

在超级复合物的发现之初,许多科学家质疑其 是否是实验技术局限所导致的假象。直到2008年, Enriquez^[9]通过测定电子供体消耗和氧气消耗的方 法验证了超级复合物的呼吸活性,"呼吸体"的概念 才被大家广泛接受。具有完整的呼吸活性(消耗电 子供体和氧气产生水)的呼吸链超级复合物被称为 呼吸体。

组合形式不同的超级复合物所适应的代谢通路也不尽相同。比如,最主要的呼吸体形式I₁III₂IV₁只能完成NADH的氧化,而NADH主要是葡萄糖代谢的产物;超级复合物III₂IV₁则不同,它可以接受来自复合物II的辅酶Q,进而完成FADH的氧化,而FADH则是琥珀酸盐以及3-磷酸甘油的代谢产物。不同组成形式的超级复合物在线粒体上的存在比例会随着细胞状态的变化而不断调整,以满足细胞不同生长状态下特定的能量需求^[18]。

现在的理论认为,在正常的生理条件下,多种 超级复合物,甚至是单独的复合物I~IV都是有生理 活性的。也就是说,虽然形成超级复合物可以有效 地提高能量代谢效率,但并不是所有单独的复合物 都会相互结合形成超级复合物,而是单独的呼吸复 合物与各类超级复合物之间处于动态平衡当中,以 适应不同生理状态下细胞能量代谢的特定需求。这 一描述线粒体内膜上呼吸链蛋白质复合物组织形式 的模型被称为动态模型^[1]。

2016年9月,我们课题组在《自然》杂志发表研 究长文,首次获得了哺乳动物呼吸体3.97~5.40埃的 中高分辨率结构^[16],并于同年12月在《细胞》杂志 上发文,解析了哺乳动物呼吸体整体4.0埃、局部3.6 埃的高分辨率结构^[12]。我们的结构对超级复合物存 在以及底物通道理论提供了有力的证据。随着研 究工作的不断深入,我们发现了呼吸体并不是呼吸 链复合物最高级的组织形式,在正常的生理条件下, 一些这些复合物之间的聚合程度甚至可以更高,我 们称之为超超级复合物(I₂III₂IV₂),这一成果发表在 2017年9月份的《细胞》杂志上^[19]。

3 超超级复合物的结构介绍

高等生物线粒体呼吸链由4种基础的蛋白复合物构成,它们分别包含44种(45个蛋白亚基)蛋白亚基的复合物I(NADH脱氢酶)、4种蛋白亚基的复合物II(琥珀酸脱氢酶)、11种蛋白亚基的复合物II(细胞色素c还原酶)和15种蛋白亚基的复合物IV(细胞色素c氧化酶)。此外,这些复合物中还含有众多的电子传递辅基。我们研究组首次从体外培养的人类细胞中纯化得到了一类超超级复合物I₂III₂IV₂,它是由2个复合物I、1个复合物III的二聚体、2个复合物IV和2个细胞色素c蛋白组成的超大膜蛋白分子



A: 人源线粒体呼吸链超超级复合物结构模型; B: 线粒体膜间隙一侧, 复合物III和IV中细胞色素c结合位点。C: 线粒体呼吸链复合物完整聚合 形式预测模型I₂II₂III₂IV₂; D: 线粒体膜间隙一侧, 细胞色素c参与电子传递时在复合物III和IV之间的运动路径。Megacomplex: 超超级复合物; M: 线粒体基质; IM: 线粒体内膜; IMS: 线粒体膜间隙; CI: 复合物I; CII: 复合物II; CIII: 复合物III; CIV: 复合物IV; Cyt.c: 细胞色素c。 A,B: cartoon model of human megacomplex I₂III₂IV₂ structure on the top and circular arrangement viewed from intermembrane space side showing

图1 人源呼吸链超超级复合物整体结构 Fig.1 Human mitochondrial megacomplexes

机器,含有包括88个膜蛋白在内的142个蛋白亚基 (70种不同蛋白分子),分子量高达2.7兆道尔顿^[19]。

超超级复合物中的6个复合物单体共包含238 个跨膜螺旋,这些跨膜螺旋在线粒体内膜上处于同 一曲面上,形成1个盘状的结构。2个L状的复合物I 环绕在超超级复合物外围,中间包含着1个复合物III 的二聚体。在复合物I的尾部各有1个复合物IV,与 复合物I及中间的复合物III有相互作用,而与另一个 复合物I有所间隔。通过计算机模拟,我们发现,这 一间隔与复合物II的结构可以很好地吻合,所以不 排除纯化过程中复合物II掉落或者计算过程中复合 物II的电子密度被平均掉的可能性^[19](图1)。我们以 此模型构建出了完整的高等生物线粒体呼吸链超超 级复合物I₂II₂II₂IV₂的模型,此模型可以形成一个闭 合环,从而将所有呼吸链电子传递链蛋白复合物整 合在了一起。复合物I由跨膜臂和位于线粒体基质 的亲水臂两部分组成。在亲水臂中,1个FMN分子,1 个NADPH分子,8个FeS簇和1个锌离子被鉴定出来, 发挥电子传递的功能,在跨膜臂中鉴定出11个磷脂 分子位于蛋白亚基相互作用或者发生构象变化的关 键位点。在复合物III中,共有12个磷脂分子和6个卟 啉环分子被发现,而在复合物IV中则发现了2个卟啉 环分子。根据这些卟啉环分子的位置以及其周围氨 基酸残基的分布情况,我们可以推测出电子传递的 可能通路^[19]。

4 人源呼吸链超超级复合物结构解析的 重大意义

一百多年来,对线粒体呼吸链的研究一直都是 国际生命科学领域的热点之一。彼得·米切尔(Peter D. Mitchell)曾于1978年因提出线粒体呼吸链的化学 渗透假说而获得了诺贝尔化学奖; 1997年,英国著 名结构生物学家约翰·沃克(John E. Walker)因对线 粒体复合物V(ATP合成酶)的结构生物学研究而获 得诺贝尔化学奖。我们研究组首次获得了来源于体 外培养的人源细胞的呼吸链蛋白复合物样品,并且 运用冷冻电镜三维重构的方法首次成功解析了比呼 吸体更高聚集形式的呼吸链超超级复合物的三维结 构,证明了线粒体呼吸链复合物存在更高级的组成 形式,为此前一直处于各种猜想阶段的最高级线粒 体呼吸链复合物组织形式的存在提供了直接的证 据,是该研究领域的一项重大研究突破^[20-22]。

在近60年的研究中,高等生物线粒体呼吸链蛋 白纯化均来自于新鲜的活体动物心脏组织,由于人 源心脏的来源困难,所以人源线粒体呼吸链蛋白复 合物的结构一直没有得到解析。在经过大量的、长 期的实验条件摸索之后,我们成功地从体外培养的 人源细胞中纯化得到了大量人源呼吸链复合物蛋白 样品。这些样品不仅为解析人源呼吸链蛋白提供了 必要条件,同时也为科学家开展相关研究奠定了良 好基础。比如,线粒体呼吸链蛋白复合物一直被认 为是一类很好的药物靶标,但是科学家却因为无法 获得体外纯化的蛋白样品而不能开展其基本的药物 筛选工作。随着基因测序成本的大幅降低,相信在 不远的将来,人人都可能会有一份自己独特的基因 图谱,而一旦发现在呼吸链上某一蛋白上有突变位 点,我们可以很容易地通过其结构信息预测这一突 变是否是有害的,并可以通过基因操作在细胞水平 上进行验证。

我们的这一系列研究不仅突破性地解析了人 源线粒体超级复合物(SCI₁III₂IV₁)的原子分辨率结 构,而且根据结构分析及数据分析,我们设想了超 超级复合物(MCI₂III₂IV₂)的存在,并通过不断摸索 纯化条件最终纯化得到了这一蛋白复合物样品,解 析了目前所知的人源呼吸链蛋白质最高级的组织 形式——超超级复合物(MCI₂III₂IV₂)的中高分辨率 三维结构^[19]。研究首次解析了人类细胞来源的呼 吸链超超级复合物结构,并且首次获得了目前为止 分辨率最高的人源呼吸链复合物I和复合物III的结 构,为深刻理解在这两种复合物上突变所导致的线 粒体功能异常引起的近百种疾病提供了坚实的理论 基础^[12]。这是继我们阐释了猪源呼吸链超级复合物 I₁III₂IV₁(呼吸体)的原子分辨率三维结构之后的又一 项重大突破^[12]。

我们依据最新的结构信息提出了一个区别于 经典Q循环理论的更加合理的电子传递理论[12,16,23]。 根据Q循环理论,来自复合物I的还原态辅酶Q首先 结合在膜间隙一侧b_L附近的Qo位点, 先将一个电子 通过 c_1 传递给细胞色素 c_1 再将另一个电子通过 b_H 传 递给基质一侧结合在Qi位点上的氧化态辅酶Q形成 一个不稳定的半醌。之后, 第二个来自复合物I的还 原态辅酶Q再一次结合在Qo位点,完成相同的过程, 使结合在Qi位点好的半醌得到1个电子成为还原态 的辅酶Q。这一过程中,2个来自复合物I的辅酶Q共 传递2个电子给2个细胞色素c完成后续还原氧气的 反应,另外传递2个电子给内膜另一侧的氧化态辅酶 Q将其还原。现在看来,这一过程有诸多不合理之处, 包括以下三方面内容。(1)复合物I释放还原态辅酶 Q的位点位于基质一侧, 而Qo位点位于膜间隙一侧, 这一电子传递过程必须使辅酶Q的极性头部穿过非 极性的内膜发生翻转,本身是一个需要消耗能量的 过程。(2)在这一过程中会产生不稳定的半醌,进而 产生活性氧族对蛋白质本身具有破坏作用。(3)这一 过程会在Qi位点附近堆积还原态的辅酶Q。由于复 合物I与III之间形成一个封闭的Q池,这将不利于产 生于复合物I的辅酶Q向复合物III移动,进而降低电 子传递的效率。基于我们所解析的结构,我们提出 了一种新的通路。我们认为,产生于复合物I的还原 态辅酶Q直接结合在复合物III的Qi位点上,这将无 需使辅酶Q极性的头部跨膜翻转。还原态辅酶Q的2 个电子相继传递给b_H,经由复合物III二聚体的2个b_L, 分别传递给2个c₁,最终传递给2个细胞色素c。这一 过程中不会产生超氧自由基,并且具有最高的电子 传递效率。目前,这一理论还处于假设阶段,需要后 续更加精细的生物化学实验进行验证。

通过计算机模拟的方法,我们研究组首次将复 合物II的结构嵌入进呼吸链超级复合物的模型之中, 由此可以推论,在线粒体呼吸链中4个电子传递链蛋 白将组合成1个更大的超超级复合物来更高效地发 挥功能,从而将全部4个呼吸链复合物在结构水平统 一到了一起,巧妙地预测了呼吸链复合物全新的完 整聚合形式,为之后的研究提供了一条新的思路。 这个超大型复合物MCI₂II₂III₂IV₂是能量大分子机器 的终极形态^[19]。尤其值得一提的是,在MCI₂II₂III₂IV₂ 结构中,在靠近每一个复合物II的一侧,复合物I、复 合物III与复合物IV之间,存在着1个封闭的空腔隔间

被称为Q池。它们是辅酶Q来回穿梭于复合物I、II 与复合物III的通路。这一封闭的Q池的存在极大地 提高了复合物I、II与复合物III之间电子传递的效 率,不仅可以很好地解释以往发现的复合物I和复合 物II共同使用同一来源的Q作为底物,而且还可以很 好地解释以往发现的这一系统是如何反向用琥珀酸 合成NADH的。在超超级复合物的结构中,复合物 III与复合物IV的细胞色素c结合位点相互靠近,只有 10 nm,提高了复合物III与复合物IV之间进行电子传 递的效率。有意思的是,在我们解析超超级复合物 I2III2IV2结构中,复合物III的每一个单体上都结合了 一个细胞色素c蛋白亚基,说明两个亚基都参与了电 子传递的过程[19]。结构分析表明,该结合的细胞色 素c处于正在结合到可以适合电子传递的位置的状 态,由此,我们通过结构分析发现了学界争论已久的 细胞色素c池的位置。这一发现可以推测,细胞色素 c的池子处于复合物I、复合物III及复合物IV的膜间 隙表面,且以逆时针方向运动。目前所有的教科书 中, 均把各个呼吸链复合物作为一个个独立的单元 来进行描述,我们的发现将在未来更好地指导这些 教科书的编写。

人类线粒体呼吸链系统异常会导致如阿兹海 默综合征、帕金森综合征、多发性硬化、少年脊髓 型共济失调以及肌萎缩性脊髓侧索硬化症等多种疾 病^[24-27]。由于人源线粒体呼吸链蛋白复合物的纯化 条件极为苛刻、难度系数大,所以针对这些蛋白的 药物筛选一直都很难开展。我们研究组建立的一系 列蛋白纯化方法和技术为今后的药物研发打下了良 好的基础,其结构的解析不仅阐明了这些蛋白的作 用方式及反应机理,也为人类攻克线粒体呼吸链系 统异常所导致的疾病提供了一个良好的开端。我们 今后将对线粒体呼吸链继续进行更加深入的研究, 希望获得处于不同反应中间态的呼吸链复合物群的 分辨率更高的三维结构,并将致力于研发治疗线粒

5 结语

生死只在呼吸之间。呼吸是机体最基本的生命 活动,最为平常却十分神秘。针对呼吸作用的研究, 我们研究组目前已经走在了世界前列,但是许多重 要的细节仍在等待未来科学家们通过共同的努力来 加以阐述。希望我们的研究能为人类对生命现象的 认知作出更大的贡献。

参考文献 (References)

- 1 Enriquez JA. Supramolecular organization of respiratory complexes. Annu Rev Physiol 2016; 78: 533-61.
- 2 Guo R, Gu J, Wu M, Yang M. Amazing structure of respirasome: unveiling the secrets of cell respiration. Protein Cell 2016; 7(12): 854-65.
- 3 Hatefi Y, Haavik AG, Fowler LR, Griffiths DE. Studies on the electron transfer system. XLII. Reconstitution of the electron transfer system. J Biol Chem 1962; 237: 2661-9.
- 4 Mitchell P. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. Nature 1961; 191: 144-8.
- 5 Abrahams JP, Leslie AG, Lutter R, Walker JE. Structure at 2.8 A resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. Nature 1994; 370(6491): 621-8.
- 6 Iwata S, Ostermeier C, Ludwig B, Michel H. Structure at 2.8 A resolution of cytochrome c oxidase from Paracoccus denitrificans. Nature 1995; 376: 660-9.
- 7 Yoshikawa S, Shinzawa-Itoh K, Nakashima R, Yaono R, Yamashita E, Inoue N, *et al.* Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome c oxidase. Science 1998; 280(5370): 1723-9.
- 8 Xia D, Yu CA, Kim H, Xia JZ, Kachurin AM, Zhang L, *et al.* Crystal structure of the cytochrome bc1 complex from bovine heart mitochondria. Science 1997; 277(5322): 60-6.
- 9 Yankovskaya V, Horsefield R, Törnroth S, Luna-Chavez C, Miyoshi H, Léger C, *et al.* Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. Science 2003; 299(5607): 700-4.
- 10 Sun F, Huo X, Zhai Y, Wang A, Xu J, Su D, *et al.* Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II. Cell 2005; 121(7): 1043-57.
- 11 Vinothkumar KR, Zhu J, Hirst J. Architecture of mammalian respiratory complex I. Nature 2014; doi: 10.1038/nature13686.
- 12 Wu M, Gu J, Guo R, Huang Y, Yang M. Structure of mammalian respiratory supercomplex I1III2IV1. Cell 2016; 167(6): 1598-609 e10.
- 13 Feng Y, Li W, Li J, Wang J, Ge J, Xu D, *et al.* Structural insight into the type-II mitochondrial NADH dehydrogenases. Nature 2012; 491(7424): 478-82.
- 14 Wu K, Li W, Yu L, Tong W, Feng Y, Ling S, et al. Temperaturedependent ESR and computational studies on antiferromagnetic electron transfer in the yeast NADH dehydrogenase Ndi1. Phys Chem Chem Phys 2017; 19(6): 4849-54.
- 15 Yang Y, Yu Y, Li X, Li J, Wu Y, Yu J, *et al.* Target elucidation by cocrystal structures of NADH-ubiquinone oxidoreductase of plasmodium falciparum (PfNDH2) with small molecule to eliminate drug-resistant malaria. J Med Chem 2017; 60(5): 1994-2005.
- 16 Gu J, Wu M, Guo R, Yan K, Lei J, Gao N, et al. The architecture of the mammalian respirasome. Nature 2016; 537(7622): 639-43.
- 17 Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. EMBO J 2000; 19(8): 1777-83.

- 18 Sun D, Li B, Qiu R, Fang H, Lyu J. Cell type-specific modulation of respiratory chain supercomplex organization. Int J Mol Sci 2016; doi: 10.3390/ijms17060926.
- 19 Guo R, Zong S, Wu M, Gu J, Yang M. Architecture of human mitochondrial respiratory megacomplex I2III2IV2. Cell 2017; 170(6): 1247-57.e12.
- 20 Sousa PM, Videira MA, Santos FA, Hood BL, Conrads TP, Melo AM. The bc:caa3 supercomplexes from the Gram positive bacterium Bacillus subtilis respiratory chain: a megacomplex organization? Arch Biochem Biophys 2013; 537(1): 153-60.
- 21 Heinemeyer J, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R. A structural model of the cytochrome C reductase/oxidase supercomplex from yeast mitochondria. J Biol Chem 2007; 282(16): 12240-8.
- 22 Bultema JB, Braun HP, Boekema EJ, Kouril R. Megacomplex organization of the oxidative phosphorylation system by structural analysis of respiratory supercomplexes from potato.

Biochim Biophys Acta 2009; 1787(1): 60-7.

- 23 Guo R, Gu J, Wu M, Yang M. Amazing structure of respirasome: unveiling the secrets of cell respiration. Protein Cell 2016; 7(12): 854-65.
- 24 Bakthavachalam P, Shanmugam PS. Mitochondrial dysfunctionsilent killer in cerebral ischemia. J Neurol Sci 2017; doi: 10.1016/ j.jns.2017.02.043.
- 25 Menezes MJ, Riley LG, Christodoulou J. Mitochondrial respiratory chain disorders in childhood: insights into diagnosis and management in the new era of genomic medicine. Biochim Biophys Acta 2014; 1840(4): 1368-79.
- 26 Rodenburg RJ. Mitochondrial complex I-linked disease. Biochim Biophys Acta 2016; 1857(7): 938-45.
- 27 Wirth C, Brandt U, Hunte C, Zickermann V. Structure and function of mitochondrial complex I. Biochim Biophys Acta 2016; 1857(7): 902-14.