

线粒体呼吸链复合体I

李凤杰¹ 沈丽君¹ 方合志^{1*} 白益东^{1,2*}¹温州医科大学检验医学院、生命科学学院,温州 325035; ²德州大学医学中心,圣安东尼奥 78229,美国)

摘要 线粒体呼吸链复合体I(简称复合体I)是呼吸链电子传递的起始复合体,作为电子传递过程的限速酶,复合体I的分子量远大于其余的四个呼吸链复合体。复合体I相关的疾病发生除了与40余个复合体I组成亚基的突变相关外,还同参与其组装的多个组装因子存在密切联系。该文对复合体I的结构以及参与调控复合体I组装的各类组装因子进行了综述,旨在为全面了解复合体I相关疾病的发生提供具体参考。

关键词 线粒体;呼吸链复合体I;组装因子

Mitochondrial Respiratory Complex I

Li Fengjie¹, Shen Lijun¹, Fang Hezhi^{1*}, Bai Yidong^{1,2*}¹School of Laboratory Medicine and Life Science, Wenzhou Medical University, Wenzhou 325035, China;²University of Texas Health Science Center, San Antonio 78229, USA)

Abstract Mitochondrial respiratory complex I (NADH: ubiquinone oxidoreductase) is the initial and rate limiting enzyme in electron transfer chain (ETC). In all five respiratory complexes, complex I is the largest enzyme with a molecular weight about 1 MDa. Mutations in both 45 subunits of complex I and its assemble factors have been implicated in many diseases. To provide a comprehensive understanding of complex I in human diseases, the complex I structure and the assembly of complex I were discussed in this review.

Key words mitochondria; respiratory complex I; assemble factor

线粒体是细胞内重要的细胞器,人体内约90%的ATP由位于线粒体的ATP合成酶产生。通常情况下,一分子葡萄糖在细胞质基质中经糖酵解分解后产生两分子丙酮酸。丙酮酸在线粒体内脱氢后生成乙酰辅酶A进入三羧酸循环(tricarboxylic acid cycle, TCA),并进一步通过氧化磷酸化(oxidative phosphorylation, OXPHOS)生成ATP。此外,在低血糖或线粒体自噬等应激条件下,脂肪和蛋白质能够分别分解代谢为乙酰辅酶A和 α 酮戊二酸进入TCA循环。在饥饿状态下,心肌细胞中的乙酰辅酶A合成酶2(AceCS2)能够利用来自肝脏释放的大量乙酸

合成乙酰辅酶A进入TCA循环。上述过程所合成的ATP最终通过嘌呤核苷转位分子(adenine nucleotide translocator, ANT)进入细胞质^[1]。而在ATP合成过程中,来自于TCA循环的NADH和FADH₂分别通过线粒体复合体I(NADH脱氢酶)和线粒体复合体II(琥珀酸脱氢酶),将电子通过辅酶Q传递给线粒体复合体III(细胞色素还原酶),并最终通过线粒体复合体IV还原O₂生成水。电子传递过程中释放的能量,驱使复合体I、III和IV将质子跨膜输送到线粒体内膜间隙,产生的质子梯度和电势能驱动ATP合酶合成ATP^[1-2]。

如上所述,虽然复合体I与复合体II都能够接受

收稿日期: 2014-02-12 接受日期: 2014-04-11

国家自然科学基金(批准号: 81101506)和浙江省自然科学基金(批准号: LZ12H12001、Y2110605/C0605)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0577-86699211, E-mail: hezhifang990909@gmail.com; yidongbai@gmail.com

Received: February 12, 2014 Accepted: April 11, 2014

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.81101506) and Zhejiang Provincial Natural Science Foundation (Grant No.LZ12H12001, Y2110605/C0605)

*Corresponding authors. Tel: +86-577-86699211, E-mail: hezhifang990909@gmail.com; yidongbai@gmail.com

网络出版时间: 2014-07-25 09:50

URL: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.11844/cjcb.2014.08.0037.html>

其特定的电子供体来促使ATP的产生。但是除糖酵解外, TCA循环中产生的NADH与FADH₂的比例为3:1。并且NADH的P/O约为FADH₂的1.5倍。也就是说, 线粒体内大多数的ATP是由经过复合体I的电子传递产生的。在线粒体内实施电子传递的4个呼吸链复合体(复合体I、II、III和IV)中, 复合体I是其中最大也最为复杂的一个蛋白。除此之外, 复合体I也是线粒体中除复合体III外活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生的主要位点。因此, 许多疾病, 尤其是退行性疾病的发生, 被证明与复合体I的功能缺失密切相关^[3]。虽然已经有公认模型解释复合体I行使其NADH脱氢以及电子传递功能的机制, 但是由于人类复合体I的晶体结构一直无法解析, 关于电子是如何在复合体I内传递的机制仍然不明确^[4-5]。近年的研究表明, 复合体I的缺陷除了与相关编码基因有关外, 还与一类被称之为线粒体复合体组装因子的蛋白密切相关。并且, 其他线粒体复合体的功能变化也能协同引起复合体I的功能异常。所有种种至今无法明确的现象, 都使得我们对明确复合体I在人类疾病发生发展中的分子机制研究止步不前^[6]。本文试图对线粒体复合体I相关的研究做一个比较完整的介绍, 希望以此促进复合体I相关疾病研究的进行。

1 复合体I的结构

人线粒体复合体I由45个亚基组成, 其分子量约为1 000 kDa。其中由线粒体DNA编码的亚基有7个, 分别为ND1、ND2、ND3、ND4、ND4L、ND5和ND6, 其余38个亚基则由核基因编码(图1)。值得一提的是, 原核细胞的复合体I亚基数为14个, 除有些没有复合体I的生物体外(如酿酒酵母), 这些亚基组成被认为是复合体I进行氧化反应所需的最少亚基数。这些亚基包括核基因编码行使NADH氧化脱氢功能的NDUFV2、NDUFV1和NDUFS1, 核基因编码行使电子传递作用的NDUFS2、NDUFS3、NDUFS7和NDUFS8, 以及组成质子传递通道的所有线粒体DNA编码的7个ND亚基。对于人而言, 剩下的31个辅助亚基被认为是维持复合体I结构、预防复合体I损伤的保护性亚基。当然, 由于复合体I研究的局限性, 这些亚基极有可能具有其他的功能, 如GRIM19(NDUFA13)与肿瘤的发生有关^[7]。2012年的最新研究认为, 位于线粒体复合体I的总亚基数为44个, 他们认为位于线粒体内膜具有单个跨膜结构域的NDUFA4不属于复合体I, 而是复合体IV的一个亚基(图1)^[8]。更有研究认为, 细胞内并没有完整而单独的线粒体复合体I存在^[9]。

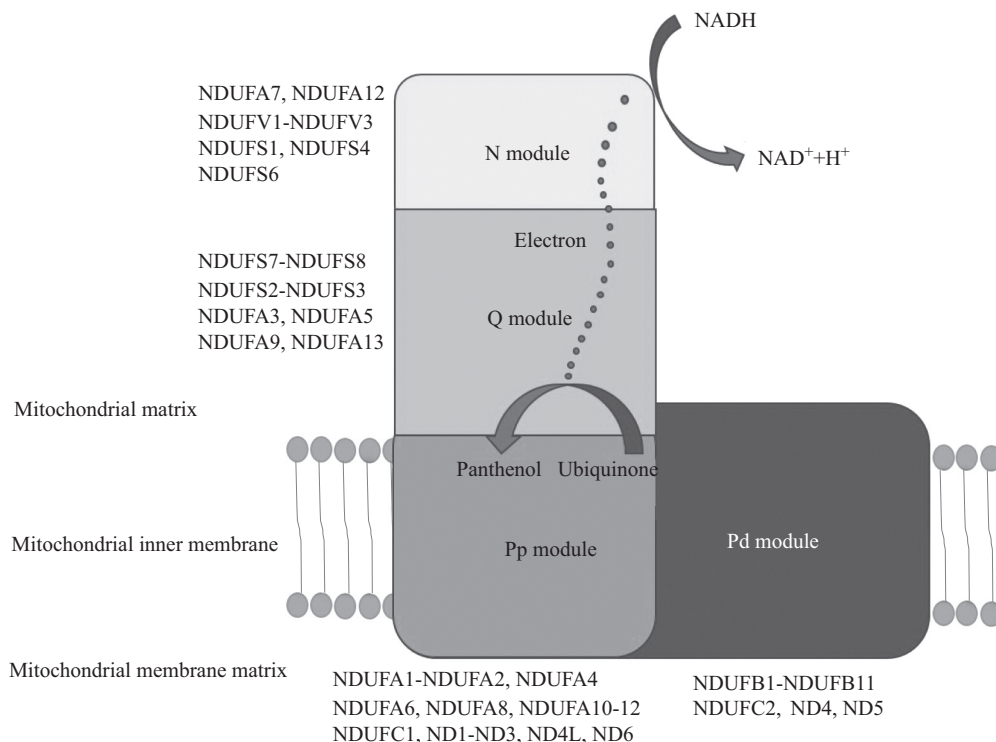


图1 线粒体复合体I结构

Fig.1 Structure of mitochondrial respiratory complex I

对于线粒体结构的研究早在50年前就已开始。早在50年前研究者就已经纯化得到来自哺乳动物牛心的线粒体复合体I^[10], 而且除线粒体复合体I外, 哺乳动物线粒体复合体II、III、IV和V的晶体结构均已在2005年之前相继被解析得到。2013年, 第一个完整的复合体I的晶体结构得到解析, 不过仍然只是来自原核生物的嗜热菌^[4], 该嗜热菌的线粒体复合体I的分子量约为500 kDa, 其较小的分子量是其能够成功被解析的重要原因之一, 而在这之前关于线粒体复合体I膜臂(membrane arm, MA)的晶体结构解析也是来自于原核生物^[11-12]。由于原核生物与真核生物具有及其相似的复合体I核心亚基, 因此嗜热菌呼吸链复合体I结构的完整解析对哺乳动物复合体I电子传递及其功能的解释仍具有极大的意义。2013年的这一研究不仅验证性地解析出之前在大肠杆菌中已经确认的3个质子转运通道Nqo12/NuoL/ND5、Nqo13/NuoM/ND4和Nqo14/NuoN/ND2(嗜热菌/大肠杆菌/哺乳动物, 以下同), 还鉴定出嗜热菌中存在的第四个质子转运通道。该通道靠近泛醌结合位点的部分由Nqo8/NuoH/ND1构成, 剩余的部分由Nqo11/NuoK/ND4L和Nqo10/NuoJ/ND6亚基组成。另外, 由于NADH电子传递的方式为NADH→FMN→Fe-S→辅酶Q(泛醌), 而之前的研究发现, 实施电子传递的最后一个铁硫簇N2距离呼吸链膜的距离约为25~30 Å, 因此认为泛醌可能需要离开线粒体内膜到N2附近接受电子^[11]。但是2013年的这一研究发现, 泛醌的结合位点位于Nqo4、6和8之间, 表明泛醌通过深入到复合体I内部接受N2传递的电子。结构解析还发现, N2与泛醌的距离约为12 Å, 这一距离在理论上能够有效地完成电子传递。另外, 由于泛醌结合位点与第四质子转运通道的关键亚基Nqo8紧密相连, 推测N2传递电子到泛醌的过程通过第四质子转运通道来介导长距离的四个质子通道(180 Å)的构象变化, 并最终引发质子的转运。

相比之下, 哺乳动物的复合体I约为1 000 kDa, 虽然其线粒体复合体I仍如50年前所说的一样容易纯化得到。但是大分子量的哺乳动物复合体I极不稳定, 一次的冻融或者轻微的物理震荡都能破坏复合体I的结构。通常情况下, 哺乳动物复合体I分离纯化和活性保持需要很温和的条件, 常使用DDM(*n*-dodecyl-*b*-D-maltoside)作为温和变性剂, 同时还需要在缓冲液中添加磷脂分子, 特别是心磷脂, 来保持复

合体I的活性和结构完整性, 其他变性剂则会或快或慢地降解复合体I。相对于DDM, 我们使用过更为温和的变性剂digitonin作为呼吸链复合体蛋白提取试剂, 该变性剂不仅能够保证复合体I的完整性, 还能够维持呼吸链超级复合体(respiratory supercomplex)的结构。尽管如此, 复合体I的结构仍极易受到外界环境的影响。在我们及我们的合作者之间进行的基于电镜的哺乳动物线粒体复合体I重构的研究过程中, 我们发现, 即使不经过冻融, 常温下放置1 h将使所有的复合体I丧失完整性。因此, 哺乳动物线粒体复合体I的晶体结构获取极为困难。但基于电镜的复合体I重构研究以及分子生物学相关的功能研究推测, 哺乳动物线粒体复合体I仍然是经典的L型结构(图1)^[12-15]。根据各模块所行使的功能分割, 我们将行使NADH氧化脱氢功能的亚复合体模块称之为N模块, 将行使电子传递功能的亚复合体模块称之为Q模块, 将行使质子传递功能的模块称之为P模块。其中, N与Q模块位于线粒体基质, P模块则位于线粒体内膜与外膜间。辅酶Q直接作用于Q模块, 接受来自N模块NADH脱氢的电子并继续传递给呼吸链复合体III。P模块又分为远离N&Q的Pd模块和与N&Q直接相连的Pp模块。原先的假设认为, 一个NADH脱氢后导致P模块变形从而促使4个质子流向线粒体膜间隙^[6]。最近的研究表明, 在敲除酵母中的*nb8m*基因后(复合体I的一个辅助亚基), 虽然复合体I失去了一部分的P模块, 但是其近端完整的Pp模块仍能泵出一半的质子到线粒体膜间隙^[4], 这也进一步证实了之前提出的P模块有两条质子泵出通道的假设^[12]。

2 复合体I的组装

线粒体呼吸链复合体的存在形式有多种理论。第一种假设也是最为经典的理论模型, 我们称之为流体模型(fluid model)^[17]。该模型认为, 行使功能的5个复合体分别位于线粒体内膜上, 复合体之间不存在实质上的相互作用或者相互接触。泛醌和细胞色素C作为电子传递的载体在各个复合体之间游走。然而这个模型电子传递效率无疑是最底的, 随着线粒体膜蛋白分离电泳技术以及基于电镜的复合体重构技术的发展, 随之诞生的是另一个被称为呼吸链复合体固体模型(solid model)的理论模型。该模型认为, 线粒体的5个复合体紧密连接并组合成一个超级复合体。泛醌和细胞色素C直接镶嵌于复合体I与

III以及III与IV之间进行电子传递。这个模型电子传递效率无疑远高于第一个流体模型^[18]。然而之后大量的研究发现,虽然包含多个线粒体复合体的超级复合体能够通过使用轻度去污剂digitonin溶解得到,但是很多超级复合体要么只有复合体I与III缺少了关键的复合体IV,要么有III和IV没有I,或者即使有I、III和IV的超级复合体但却没有关键的复合体V进行ATP合成^[18-19]。来自西班牙的研究人员进行综合分析概括后,认为线粒体内可能同时存在这两个模型,假设并称之为流体可塑模型(plasticity model),基于该模型的实验也验证了I/II/III/IV以及I/III/IV存在电子传递活性^[20]。

作为电子传递链的重要起始复合体,复合体I是超级复合体的必要组成部分。在非变性凝胶(native page, NP)分析中发现,80%以上的复合体I以超级复合体形式I/III、I/II/III/IV、I/III/IV或者I/III/V形式存在。而其他复合体II、III、IV以及V大部分都以单体形式存在于线粒体内膜上^[21-22]。作为5个线粒体复合体中最大的一个,人线粒体复合体I中的44或45个亚基是如何组装以及在组装过程中有哪些蛋白起到协助作用仍然不太明确。甚至有观点认为复合体I在组装过程中同时进行着超级复合体的组装,复合体I的组装本质上是超级复合体骨架的形成^[9]。这意味着完整的单个复合体I并不存在。这个观点认为,复合体I首先组装成一个约830 kDa的超级复合体中间体,随后复合体III和来自复合体IV的COX4与COX5a加入这个中间体,来自复合体IV的COX2与复合体I的NDUFS4紧接着加入超级复合体骨架,复合体IV剩余的亚基也在此后加入到这个骨架之中以便形成有功能活性的复合体IV,最后一个加入这个超级复合体骨架的是N模块的主要组成部分NDUFV1,从而最终产生有功能活性的超级复合体^[9]。而我们的研究认为,这样的组装模式可能是错误的,我们发现,NDUFS4并不是一个很晚组装的复合体I亚基,在非变性凝胶分析中NDUFS4出现在早期的800 kDa复合体I骨架中。在酶活性分析中,我们发现1 000 kDa及其以下的复合体I或者亚复合体I均存在明显的NADH脱氢作用,这表明,NDUFV1其实不是最后一个参与组装的复合体亚基(未发表)。与我们的观点类似,大部分研究认为存在独立完整的复合体I组装过程^[15-16]。

不管是进化生物学分析还是蛋白结构解析的

研究都认为,低等原核生物的细菌和高等哺乳动物的人之间,其复合体I的基本结构极其相似^[11,13,23]。因此研究普遍认为存在一个统一的基本骨架组装^[15-16,24-25],复合体I的组装以Q模块为中心开始,Q模块组装完成后通过ND1(也有认为通过ND1和ND5)锚定到线粒体内膜上。待Q模块锚定到内膜上后,以线粒体内膜端Q模块为起始完成P模块的延伸和组装。最后,位于线粒体基质的N模块装配到Q模块上完成复合体I的最后装配。由于人线粒体复合体I包含有45个亚基,而2012年的新研究则认为只有44个亚基^[8],数目繁多的亚基数使得复合体I各亚基的组装顺序仍然不得而知。目前,哺乳动物线粒体复合体I装配过程的研究大多基于临床上或实验室偶然得到的某一亚基突变细胞^[26-27]。基于非变性凝胶技术的研究表明,线粒体复合体I的组装模型大致如下^[25,28]:首先,NDUFS2与NDUFS3的复合体与NDUFS7和NDUFS8的复合体结合形成Q模块骨架,NDUFA9或其他亚基加入Q模块骨架后锚定到线粒体内膜上。随后,包含ND1亚基的部分P模块骨架与Q模块骨架结合形成约400 kDa的亚复合体,该亚复合体与另一个约460 kDa大小且包含ND2、ND3、ND6以及NDUFB6的膜复合体结合形成更大的复合体,在ND4与ND5加入之后,该复合体可达830 kDa。最后,包含NDUFV1, 2, 3以及NDUFS1, 4, 6和NDUFA12的N模块组装到830 kDa复合体上形成完整的复合体I结构,但是针对亚复合体及其辅助亚基的组装过程尚不明确。最近的研究还表明,线粒体复合体I的各游离亚基能够替换完整复合体I的各个亚基^[29]。其中,各亚基的替换速率不同,但替换均发生在24 h内。研究者观察了NDUFV1、NDUFV2、NDUFS1-4、NDUFS6-8、NDUFA2、NDUFA12、NDUFA1、NDUFB6和NDUFB8亚基的替换速率,这些亚基有些位于线粒体基质,有些则位于线粒体内膜上。他们的替代机制是否相同,是否需要组装因子协助完成替代都不得而知。与此同时,同位素质谱分析发现,线粒体复合体亚基的半衰期大部分在500 h以上,最低的半衰期也为300 h,而复合体I的亚基半衰期均在500 h以上^[30]。如果复合体I的亚基的替换发生在24 h之内,那么为什么亚基的半衰期却是几十倍地高于亚基替换时间?这些问题都使得复合体I的装配机制解释极其困难。

复合体I的装配除了必需的复合体I亚基外,还

需要数量众多的装配因子协助完成。在复合体I装配的早期阶段, NDUFAF1编码的CIA30蛋白协助Q模块骨架的400 kDa亚复合体与包含ND2的膜复合体结合。如果缺少NDUFAF1, 不仅无法进一步与ND2相关的480 kDa复合体组装成更大的830 kDa复合体, 早期的380 kDa亚复合体也将在若干小时后去组装^[31]。而作为Toll样受体通路和BMP(bone morphogenetic protein)通路的接头蛋白Ecsit^[32-33], 能够与线粒体内的NDUFAF1相互作用来影响复合体I的组装。RNA干扰Ecsit之后, 能够导致与NDUFAF1缺失一样的复合体I组装障碍。且Ecsit的低表达也进一步抑制NDUFAF1的表达水平^[33]。

乙酰辅酶A脱氢酶9(acyl-CoA dehydrogenase family member 9, ACAD9)从结构上与长链乙酰辅酶A脱氢酶(very-long-chain acyl-CoA dehydrogenase, VLCAD)非常相似。但是ACAD9不具有长链脂肪酸氧化功能, 且被发现与复合体I的组装有关。低表达的ACAD9将导致线粒体复合体I功能缺陷。ACAD9被发现与NDUFAF1以及Ecsit形成复合体结构, 提示其极有可能通过影响NDUFAF1来调节复合体I的功能^[34]。进一步的研究揭示, ACAD9的低表达能够导致NDUFAF1、Ecsit和线粒体复合体I水平的降低^[34]。ACAD9作为装配因子的证据也被全基因组外显子测序所验证^[35]。

NDUFAF2, 也被称之为B17.2L、MMTN或mimitin, 与后期的复合体I组装有关。NDUFAF2被发现与830 kDa的亚复合体I存在相互作用, 而不与低分子量的380 kDa和480 kDa亚复合体相互作用。缺乏NDUFAF2将使830 kDa的亚复合体I无法组装生成, 并导致380 kDa和480 kDa的亚复合体累计, 因而研究认为NDUFAF2是复合体I组装的后期装配因子。同时, NDUFAF2还有可能与复合体I和复合体III的超复合体组装有关^[36]。NDUFAF2突变的细胞除了能够降低复合体I功能外, 还能引起复合体III功能的轻微变化, 这进一步提示了NDUFAF2在复合体I/III组装过程中也发挥着重要的作用^[37]。

NDUFAF3与NDUFAF4, 也被称之为C3orf60和C6orf66, 与复合体I的前期组装有关。在复合体I的早期组装阶段, 研究发现早期Q模块复合体I中, NDUFS2、NDUFS3、NDUFS5以及NDUFS8都与NDUFAF3及NDUFAF4存在相互作用。且NDUFAF3与NDUFAF4之间也存在相互作用^[38]。在NDU-

FAF3与NDUFAF4的突变细胞中, NDUFS2, 3, 7, 8以及包含NDUFA9的Q模块将无法与包含ND1的线粒体内膜P模块组装。这种早期组装缺陷也直接导致了包含ND1的P模块蛋白被AGF3L2蛋白酶快速水解^[39]。在GFP标记的NDUFAF4和NDUFAF3过表达细胞中, 研究还发现, NDUFAF4与NDUFAF3在协助400 kDa(包含部分Q和P模块)亚复合体组装后并未脱离, 同NDUFAF1、Ecsit和NDUFAF2一样, 他们都在复合体I完成全部组装后脱离复合体I回到线粒体基质^[38]。表明这些早期或者中期的复合体I装配因子, 极有可能参与了中晚期的复合体I装配。

曾被称之为C20orf7的NDUFAF5也是复合体I早期装配的组装因子。NDUFAF5突变的细胞将无法形成400 kDa的未完全组装亚复合体。通常认为NUFAF5直接影响了包含ND1的早期P模块组装, 并进一步导致包含NDUFS2, 3, 7, 8及NDUFA9的Q模块无法与之结合。同NDUFAF3和NDUFAF4类似, NDUFAF5低表达也直接影响ND1表达水平, 具体表现为NDUFAF5能直接影响ND1蛋白翻译及更新^[40]。除了对复合体I早期组装的影响外, NDUFAF5还被发现能够影响复合体IV的活性^[41]。对NDUFAF5的功能预测发现, NDUFAF5也具有甲基化转移酶活性。推测NDUFAF5极有可能通过对复合体I亚基的甲基化来影响复合体I的组装^[42]。研究发现, 发生在甲基化转移酶功能区域的突变虽然也能导致复合体I的组装异常, 但是仍有30%~70%的复合体I能够被完整组装^[42]。

同NDUFAF5的功能类似, NDUFAF6也是复合体I早期组装的重要因子。Pagliarini等^[43]在2008年最早鉴定了NDUFAF6这个组装因子。在进一步的机制研究中发现, NDUFAF6突变的成纤维细胞无完整组装的复合体I。同NDUFAF5的作用机制一样, NDUFAF6突变的细胞将直接影响线粒体DNA编码的ND1合成及其稳定性。但是NDUFAF6缺失的细胞仍能形成早期及中期的亚复合体I, 但是这些早中期的亚复合体在缺少ND1基因情况下是否稳定仍不得而知^[44]。

根据蛋白结构及组成, NDUFAF7是一类甲基化转移酶。NDUFAF7定位于线粒体基质, 该蛋白能够甲基化NDUFS2的Arg-85残基。这一甲基化过程被认为是400 kDa线粒体早期亚复合体能够稳定存在并锚定到线粒体内膜的关键修饰^[45]。在NDUFAF7

缺失细胞中, 包含NDUFS2, 3, 7, 8以及部分内膜复合体的400 kDa亚复合体极不稳定。除NDUFS2外, ND1以及NDUFS7的表达水平在120 h之后大量下调。相反地, 膜臂460 kDa复合体则因为不能与400 kDa复合体进一步组装而大量累积^[45]。

TMEM126B是一个功能未知的跨膜蛋白, 该蛋白在哺乳动物中相当保守^[46]。在线粒体复合体组学相关的质谱研究中发现, TMEM126B与NDUFAF1、Ecsit和Acad9存在共迁移现象。进一步的功能实验验证了TMEM126B低表达抑制了830 kDa亚复合体的生成, 仅保留80 kDa以及260 kDa的早期复合体I中间体, 提示TMEM126B可能是复合体I的早期装配因子^[47]。

2013年, John E. Walker的研究小组^[6]利用RNA干扰技术(RNAi)构建了一个143B细胞的复合体I组装缺陷模型, 随后利用免疫共沉淀和质谱分析技术对复合体I的组装因子进行筛选。除TMEM126B外, 该研究发现了另一个新的复合体I组装因子C3orf1。另外, 该研究对以往研究中认定的400, 460, 650, 830 kDa复合体I中间体重新评估后得出新的复合体I中间体分子量分别为315, 370, 550, 815 kDa。另外, 该研究所提供的复合体I组装过程与之前的报道类似, 不同点在于, C3orf1虽然同NDUFAF3和NDUFAF4一起参与了315(原400) kDa复合体I中间体的组装^[25], 但是与NDUFAF3和NDUFAF4不同的是, C3orf1同时也参与了315(原400) kDa与370(原460) kDa复合体I中间体的进一步组装。同C3orf1的作用类似, TMEM126B在参与370(原460) kDa复合体I中间体组装的同时也参与了315(原400) kDa与370(原460) kDa中间体的组装。

除了上述这些常规的参与线粒体复合体I组装的因子外, 还有一些铁硫蛋白如Ind1^[48]、NBP35^[49]等都是线粒体复合体I能够完整组装的重要因子。线粒体内蛋白总数为1 000多个, 除参与氧化磷酸化、脂代谢、氨基酸代谢、电子传递等功能的蛋白, 仍有大量功能未知的蛋白存在。Pagliarini等^[43]在研究中也发现, 仍有大约300个基因(约26%)的功能没有得到注释。且同复合体I相比, 复合体IV虽然只有13个亚基却有超过20个的复合体IV组装因子^[50], 因而研究推测复合体I还有约20个新的组装因子未被发现。复合体I组装缺陷是新生儿最为致命的缺陷之一, 患者的生存时间往往无法超过3~5年。对复合体I组装机制的完全了解, 将会使复合体I组装缺陷相关疾病的诊断和基因治疗的进行有充分的理论基础。

3 复合体I与疾病发生

复合体I是5个呼吸链复合体中最大的一个, 且是电子传递的起点, 因而对复合体I的研究也是开展最多的。复合体I与疾病的相关性研究大致可以分为以下两类: (1)复合体I 45个亚基中的一个或几个因为编码基因的突变引起亚基的缺失或者复合体I组装因子的突变, 导致复合体I不能成功组装或者组装完成的复合体I稳定性降低。各类复合体I组装因子的遗传性突变, 通常能够引起新生儿的Leigh氏综合征或者线粒体脑病^[35,40]。而线粒体DNA编码的复合体I亚基突变导致的复合体I去组装同样能够导致Leigh病^[51]。(2)因为复合体I亚基编码基因的突变、亚基编码基因的翻译异常导致的复合体I功能下降或者完全无功能。虽然这样的突变不影响复合体I的组装, 但是复合体I的NADH脱氢模块、电子传递模块或者质子泵出模块的反应核心遭到了完全破坏或者一定程度的功能降低, 这一类突变同样能够引起Leigh病^[52]、线粒体脑肌病(mitochondrial encephalopathy, lactic acidosis, and stroke-like symptoms, MELAS)^[53]、Leber遗传性视神经病(Leber's hereditary optic neuropathy, LHON)^[54]以及包括癌症在内的一些其他退行性疾病^[55]。这一类突变虽然主要是改变复合体I的脱氢酶活性, 但复合体I活性改变的同时也影响NAD⁺/NADH、细胞内ROS水平与线粒体ATP的产生。因此这一类复合体I的缺陷通常与多种退行性疾病有关^[5]。上述两类突变相比, 由于第一类突变通常无线粒体复合体I, 因而其疾病的进程比较快速且多发于新生儿。

对于第一类复合体I致病机理的研究晚于第二类, 主要原因为复合体I组装缺陷的研究中所使用的非变性凝胶方法直到1991年才被Hermann Shagger建立并经几年的完善才成为一个成熟的技术^[56]。而利用这一方法研究复合体I组装缺陷在疾病发生中的作用直到2000年以后才得以进行。2003年, Ugalde C的研究小组^[57]发现, 线粒体基因T14487C的突变能够使ND6第64位的氨基酸由甲硫氨酸突变为缬氨酸, 该小组利用非变性凝胶技术发现这一突变能够导致约800 kDa大小的复合体I中间体无法进一步组装成完整的复合体I, 从而引起小儿Leigh病、MELAS以及LHON的发生。值得注意的是, 与T14487C邻近的T14484C突变能够导致ND6第63位的氨基酸由甲硫氨酸突变为缬氨酸, 该位点氨基酸

的改变能够导致LHON的发生,但是却不能导致其他的线粒体病,如Leigh病、MELAS等。除复合体组成亚基突变所致的复合体组装异常外,复合体组装相关的分子伴侣或组装因子突变也能导致严重的线粒体病。2005年,第一个复合体组装缺陷相关的疾病被报道,该报道发现, *NDUFAF2*基因的突变能够导致复合体I组装缺陷,从而导致进行性脑病的发生^[36]。此后,陆续有约9~10个非复合体I组成部分的复合体I组装因子突变被报道与各类疾病的发生密切相关^[50]。而在这些疾病类型中,多数为致死性线粒体脑病,如Leigh病和MELAS等。虽然复合体I缺陷所致的ROS升高能够部分加重疾病的发生,但是由于完整的复合体I未能组装成功,致病的主要原因通常为组织中ATP供应的严重不足以及乳酸等各种代谢产物异常升高所致的细胞毒性作用。

对于第二类突变所致的复合体I相关疾病研究则相对广泛。早在1988年,Wallace等^[58]就发现,复合体I ND4亚基的11 778位点G到A的突变能够导致LHON的发生。包括ND1 G3460A和ND6 T14484C突变在内,90%以上的LHON患者存在上述三个突变中的一种类型,因而上述三个突变也被称之为LHON的原发突变位点^[59]。此外,ND6亚基G14459A的突变不仅能够引发LHON,还与肌张力障碍和Leigh病的发生有关^[60]。在核基因水平,研究发现复合体I核基因编码亚基NDUFV1的低表达能够通过影响复合体I的活性来调节细胞内NAD⁺/NADH的水平,进而影响乳腺癌的疾病进程^[61]。另外,NDUFS1、NDUFS2、NDUFS4、NDUFS7、NDUFS8和NDUFV1突变能够通过提升细胞内ROS水平来引发肥厚性心肌病和线粒体脑病等疾病^[3]。在线粒体脑病的研究中,早在1990年研究便已发现,帕金森病人脑黑质中复合体I的功能显著减低^[62],随后的研究发现帕金森病人细胞中线粒体基因编码的复合体I亚基存在高频率的突变^[63]。研究还发现,使用鱼藤酮抑制复合体I的活性后能够诱导帕金森疾病模型,进一步表明复合体I功能异常在帕金森病发生中的主导作用^[64]。

与复合体I缺陷相关的基因治疗研究开展较早,通过引入外源性的NADH脱氢酶可修复复合体I的功能。NDI1为来自酵母的二型NADH脱氢酶,NDI1能够完全替代NADH脱氢酶来起始电子传递,因而大量的研究尝试利用转基因技术通过引入NDI1来

介导复合体I缺陷引发的疾病治疗。这种治疗模式,理论上可以针对任何与复合体I相关的基因突变。这种治疗模式在上个世纪末进入线粒体研究领域,研究发现通过引入NDI1之后,复合体I功能缺陷的视网膜色素上皮细胞功能得到了极大的恢复^[65]。随后,在复合体I缺陷的骨髓瘤细胞实验中进一步证实了NDI1的基因治疗作用^[66]。基于这些基础研究,Chaderton等^[67]发现NDI1可以修复鱼藤酮饲养诱导的小鼠LHON模型。在癌症相关研究中,Sharma等^[68]发现复合体I功能异常通过提升细胞内的ROS水平来激活AKT通路,从而激活肿瘤相关的细胞通路如HIF1-alpha等,而NDI1可以通过修复AKT通路来抑制肿瘤的生长。在此基础上,Santidrian等^[61]发现NDI1除了显著降低AKT通路活性外,更重要的作用在于NDI1能够通过调节细胞内NAD⁺/NADH比例来调节细胞的自噬与MTOR通路,从而改变癌细胞的转移能力。

4 展望

作为电子传递链复合体中唯一一个结构尚未明确的复合体,复合体I相关的理论基础仍在建立当中。关于哺乳动物复合体I的结构信息仍然很少,甚至于复合体I的组成亚基数也不明确。复合体I的辅助亚基所扮演的功能也不得而知,即使是稳定核心复合体I骨架的机制也无相关阐述。此外,在复合体I组装方面,近年来陆续的有一些组装因子被发现与复合体I的组装有关,但是组装因子在协助复合体组装中的作用机制更是无从谈起。撇开这些不谈,即使是复合体I的组装顺序在不同的研究中也有一定的出入。这些最为基本的问题如能得到解决,将为复合体I相关的疾病研究提供更为坚实的理论基础。

参考文献 (References)

- 1 Wallace DC. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: A dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet* 2005; 39: 359-407.
- 2 Lin MT, Beal MF. Mitochondrial dysfunction and oxidative stress in neurodegenerative diseases. *Nature* 2006; 443(7113): 787-95.
- 3 Distelmaier F, Koopman WJ, van den Heuvel LP, Rodenburg RJ, Mayatepek E, Willems PH, *et al*. Mitochondrial complex I deficiency: from organelle dysfunction to clinical disease. *Brain* 2009; 132(Pt 4): 833-42.
- 4 Baradaran R, Berrisford JM, Minhas GS, Sazanov LA. Crystal structure of the entire respiratory complex I. *Nature* 2013; 494(7438): 443-8.

- 5 Hirst J. Mitochondrial complex I. *Annu Rev Biochem* 2013; 82: 551-75.
- 6 Andrews B, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. Assembly factors for the membrane arm of human complex I. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(47): 18934-9.
- 7 Huang G, Lu H, Hao A, Ng DC, Ponniah S, Guo K, *et al.* GRIM-19, a cell death regulatory protein, is essential for assembly and function of mitochondrial complex I. *Mol Cell Biol* 2004; 24(19): 8447-56.
- 8 Balsa E, Marco R, Perales-Clemente E, Szklarczyk R, Calvo E, Landazuri MO, *et al.* NDUFA4 is a subunit of complex IV of the mammalian electron transport chain. *Cell Metab* 2012; 16(3): 378-86.
- 9 Moreno-Lastres D, Fontanesi F, Garcia-Consuegra I, Martin MA, Arenas J, Barrientos A, *et al.* Mitochondrial complex I plays an essential role in human respirasome assembly. *Cell metabolism* 2012; 15(3): 324-35.
- 10 Hatefi Y, Haavik AG, Griffiths DE. Studies on the electron transfer system. XL. Preparation and properties of mitochondrial DPNH-coenzyme Q reductase. *J Biol Chem* 1962; 237: 1676-80.
- 11 Efremov RG, Baradaran R, Sazanov LA. The architecture of respiratory complex I. *Nature* 2010; 465(7297): 441-5.
- 12 Hunte C, Zickermann V, Brandt U. Functional modules and structural basis of conformational coupling in mitochondrial complex I. *Science* 2010; 329(5990): 448-51.
- 13 Clason T, Ruiz T, Schagger H, Peng G, Zickermann V, Brandt U, *et al.* The structure of eukaryotic and prokaryotic complex I. *J Struct Biol* 2010; 169(1): 81-8.
- 14 Drose S, Krack S, Sokolova L, Zwicker K, Barth HD, Morgner N, *et al.* Functional dissection of the proton pumping modules of mitochondrial complex I. *PLoS Biol* 2011; 9(8): e1001128.
- 15 Fassone E, Rahman S. Complex I deficiency: Clinical features, biochemistry and molecular genetics. *J Med Genet* 2012; 49(9): 578-90.
- 16 Vogel RO, Smeitink JA, Nijtmans LG. Human mitochondrial complex I assembly: A dynamic and versatile process. *Biochim Biophys Acta* 2007; 1767(10): 1215-27.
- 17 Hackenbrock CR, Chazotte B, Gupte SS. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 1986; 18(5): 331-68.
- 18 Lenaz G, Genova ML. Kinetics of integrated electron transfer in the mitochondrial respiratory chain: Random collisions vs. solid state electron channeling. *Am J Physiol Cell Physiol* 2007; 292(4): C1221-39.
- 19 Dudkina NV, Eubel H, Keegstra W, Boekema EJ, Braun HP. Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci USA* 2005; 102(9): 3225-9.
- 20 Acin-Perez R, Fernandez-Silva P, Peleato ML, Perez-Martos A, Enriquez JA. Respiratory active mitochondrial supercomplexes. *Mol Cell* 2008; 32(4): 529-39.
- 21 Schagger H. Native electrophoresis for isolation of mitochondrial oxidative phosphorylation protein complexes. *Methods Enzymol* 1995; 260: 190-202.
- 22 Schagger H, Pfeiffer K. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J* 2000; 19(8): 1777-83.
- 23 Friedrich T, Bottcher B. The gross structure of the respiratory complex I: A Lego System. *Biochim Biophys Acta* 2004; 1608(1): 1-9.
- 24 Friedrich T, Scheide D. The respiratory complex I of bacteria, archaea and eukarya and its module common with membrane-bound multisubunit hydrogenases. *FEBS Lett* 2000; 479(1/2): 1-5.
- 25 McKenzie M, Ryan MT. Assembly factors of human mitochondrial complex I and their defects in disease. *IUBMB Life* 2010; 62(7): 497-502.
- 26 Bai Y, Shakeley RM, Attardi G. Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol Cell Biol* 2000; 20(3): 805-15.
- 27 Deng JH, Li Y, Park JS, Wu J, Hu P, Lechleiter J, *et al.* Nuclear suppression of mitochondrial defects in cells without the ND6 subunit. *Mol Cell Biol* 2006; 26(3): 1077-86.
- 28 Antonicka H, Ogilvie I, Taivassalo T, Anitori RP, Haller RG, Vissing J, *et al.* Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem* 2003; 278(44): 43081-8.
- 29 Dieteren CE, Koopman WJ, Swarts HG, Peters JG, Maczuga P, van Gemst JJ, *et al.* Subunit-specific incorporation efficiency and kinetics in mitochondrial complex I homeostasis. *J Biol Chem* 2012; 287(50): 41851-60.
- 30 Vincow ES, Merrihew G, Thomas RE, Shulman NJ, Beyer RP, MacCoss MJ, *et al.* The PINK1-Parkin pathway promotes both mitophagy and selective respiratory chain turnover *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(16): 6400-5.
- 31 Dunning CJ, McKenzie M, Sugiana C, Lazarou M, Silke J, Connelly A, *et al.* Human CIA30 is involved in the early assembly of mitochondrial complex I and mutations in its gene cause disease. *EMBO J* 2007; 26(13): 3227-37.
- 32 Kopp E, Medzhitov R, Carothers J, Xiao C, Douglas I, Janeway CA, *et al.* ECSIT is an evolutionarily conserved intermediate in the Toll/IL-1 signal transduction pathway. *Genes Dev* 1999; 13(16): 2059-71.
- 33 Vogel RO, Janssen RJ, van den Brand MA, Dieteren CE, Verkaart S, Koopman WJ, *et al.* Cytosolic signaling protein Ecsit also localizes to mitochondria where it interacts with chaperone NDUFAF1 and functions in complex I assembly. *Genes Dev* 2007; 21(5): 615-24.
- 34 Nouws J, Nijtmans L, Houten SM, van den Brand M, Huynen M, Venselaar H, *et al.* Acyl-CoA dehydrogenase 9 is required for the biogenesis of oxidative phosphorylation complex I. *Cell Metab* 2010; 12(3): 283-94.
- 35 Haack TB, Danhauser K, Haberberger B, Hoser J, Strecker V, Boehm D, *et al.* Exome sequencing identifies ACAD9 mutations as a cause of complex I deficiency. *Nat Genet* 2010; 42(12): 1131-4.
- 36 Ogilvie I, Kennaway NG, Shoubridge EA. A molecular chaperone for mitochondrial complex I assembly is mutated in a progressive encephalopathy. *J Clin Invest* 2005; 115(10): 2784-92.
- 37 Hoefs SJ, Dieteren CE, Rodenburg RJ, Naess K, Bruhn H, Wibom R, *et al.* Baculovirus complementation restores a novel NDUFAF2 mutation causing complex I deficiency. *Hum Mutat* 2009; 30(7): E728-36.
- 38 Saada A, Vogel RO, Hoefs SJ, van den Brand MA, Wessels HJ,

- Willems PH, *et al.* Mutations in NDUFAF3 (C3ORF60), encoding an NDUFAF4 (C6ORF66)-interacting complex I assembly protein, cause fatal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2009; 84(6): 718-27.
- 39 Zurita Rendon O, Shoubridge EA. Early complex I assembly defects result in rapid turnover of the ND1 subunit. *Hum Mol Genet* 2012; 21(17): 3815-24.
- 40 Sugiana C, Pagliarini DJ, McKenzie M, Kirby DM, Salemi R, Abu-Amero KK, *et al.* Mutation of C20orf7 disrupts complex I assembly and causes lethal neonatal mitochondrial disease. *Am J Hum Genet* 2008; 83(4): 468-78.
- 41 Saada A, Edvardson S, Shaag A, Chung WK, Segel R, Miller C, *et al.* Combined OXPHOS complex I and IV defect, due to mutated complex I assembly factor C20ORF7. *J Inherit Metab Dis* 2012; 35(1): 125-31.
- 42 Gerards M, Sluiter W, van den Bosch BJ, de Wit LE, Calis CM, Frentzen M, *et al.* Defective complex I assembly due to C20orf7 mutations as a new cause of Leigh syndrome. *J Med Genet* 2010; 47(8): 507-12.
- 43 Pagliarini DJ, Calvo SE, Chang B, Sheth SA, Vafai SB, Ong SE, *et al.* A mitochondrial protein compendium elucidates complex I disease biology. *Cell* 2008; 134(1): 112-23.
- 44 McKenzie M, Tucker EJ, Compton AG, Lazarou M, George C, Thorburn DR, *et al.* Mutations in the gene encoding C8orf38 block complex I assembly by inhibiting production of the mitochondria-encoded subunit ND1. *J Mol Biol* 2011; 414(3): 413-26.
- 45 Rhein VF, Carroll J, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. NDUFAF7 methylates arginine 85 in the NDUF52 subunit of human complex I. *J Biol Chem* 2013; 288(46): 33016-26.
- 46 Hu RM, Han ZG, Song HD, Peng YD, Huang QH, Ren SX, *et al.* Gene expression profiling in the human hypothalamus-pituitary-adrenal axis and full-length cDNA cloning. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(17): 9543-8.
- 47 Heide H, Bleier L, Steger M, Ackermann J, Drose S, Schwamb B, *et al.* Complexome profiling identifies TMEM126B as a component of the mitochondrial complex I assembly complex. *Cell Metab* 2012; 16(4): 538-49.
- 48 Bych K, Kerscher S, Netz DJ, Pierik AJ, Zwicker K, Huynen MA, *et al.* The iron-sulphur protein Ind1 is required for effective complex I assembly. *EMBO J* 2008; 27(12): 1736-46.
- 49 Calvo SE, Tucker EJ, Compton AG, Kirby DM, Crawford G, Burt NP, *et al.* High-throughput, pooled sequencing identifies mutations in NUBPL and FOXRED1 in human complex I deficiency. *Nat Genet* 2010; 42(10): 851-8.
- 50 Nouns J, Nijtmans LG, Smeitink JA, Vogel RO. Assembly factors as a new class of disease genes for mitochondrial complex I deficiency: Cause, pathology and treatment options. *Brain* 2012; 135(Pt 1): 12-22.
- 51 Ugalde C, Hinttala R, Timal S, Smeets R, Rodenburg RJ, Uusimaa J, *et al.* Mutated ND2 impairs mitochondrial complex I assembly and leads to Leigh syndrome. *Mol Genet Metab* 2007; 90(1): 10-4.
- 52 Hoefs SJ, Dieteren CE, Distelmaier F, Janssen RJ, Eppelen A, Swarts HG, *et al.* NDUFA2 complex I mutation leads to Leigh disease. *Am J Hum Genet* 2008; 82(6): 1306-15.
- 53 Kirby DM, McFarland R, Ohtake A, Dunning C, Ryan MT, Wilson C, *et al.* Mutations of the mitochondrial ND1 gene as a cause of MELAS. *J Med Genet* 2004; 41(10): 784-9.
- 54 Brown MD, Trounce IA, Jun AS, Allen JC, Wallace DC. Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J Biol Chem* 2000; 275(51): 39831-6.
- 55 Park JS, Sharma LK, Li H, Xiang R, Holstein D, Wu J, *et al.* A heteroplasmic, not homoplasmic, mitochondrial DNA mutation promotes tumorigenesis via alteration in reactive oxygen species generation and apoptosis. *Hum Mol Genet* 2009; 18(9): 1578-89.
- 56 Wittig I, Braun HP, Schagger H. Blue native PAGE. *Nat Protoc* 2006; 1(1): 418-28.
- 57 Ugalde C, Triepels RH, Coenen MJ, van den Heuvel LP, Smeets R, Uusimaa J, *et al.* Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann Neurol* 2003; 54(5): 665-9.
- 58 Wallace DC, Singh G, Lott MT, Hodge JA, Schurr TG, Lezza AM, *et al.* Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science* 1988; 242(4884): 1427-30.
- 59 Kirches E. LHON: Mitochondrial mutations and more. *Curr Genomics* 2011; 12(1): 44-54.
- 60 Kirby DM, Kahler SG, Freckmann ML, Reddihough D, Thorburn DR. Leigh disease caused by the mitochondrial DNA G14459A mutation in unrelated families. *Ann Neurol* 2000; 48(1): 102-4.
- 61 Santidrian AF, Matsuno-Yagi A, Ritland M, Seo BB, LeBoeuf SE, Gay LJ, *et al.* Mitochondrial complex I activity and NAD⁺/NADH balance regulate breast cancer progression. *J Clin Invest* 2013; 123(3): 1068-81.
- 62 Schapira AH, Cooper JM, Dexter D, Jenner P, Clark JB, Marsden CD. Mitochondrial complex I deficiency in Parkinson's disease. *Lancet* 1989; 1(8649): 1269.
- 63 Smigrodzki R, Parks J, Parker WD. High frequency of mitochondrial complex I mutations in Parkinson's disease and aging. *Neurobiol Aging* 2004; 25(10): 1273-81.
- 64 Cannon JR, Tapias V, Na HM, Honick AS, Drolet RE, Greenamyre JT. A highly reproducible rotenone model of Parkinson's disease. *Neurobiol Dis* 2009; 34(2): 279-90.
- 65 Seo BB, Kitajima-Ihara T, Chan EK, Scheffler IE, Matsuno-Yagi A, Yagi T. Molecular remedy of complex I defects: Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria restores the NADH oxidase activity of complex I-deficient mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(16): 9167-71.
- 66 Bai Y, Hajek P, Chomyn A, Chan E, Seo BB, Matsuno-Yagi A, *et al.* Lack of complex I activity in human cells carrying a mutation in MtDNA-encoded ND4 subunit is corrected by the *Saccharomyces cerevisiae* NADH-quinone oxidoreductase (NDI1) gene. *J Biol Chem* 2001; 276(42): 38808-13.
- 67 Chadderton N, Palfi A, Millington-Ward S, Gobbo O, Overlack N, Carrigan M, *et al.* Intravitreal delivery of AAV-NDI1 provides functional benefit in a murine model of Leber hereditary optic neuropathy. *Eur J Hum Genet* 2013; 21(1): 62-8.
- 68 Sharma LK, Fang H, Liu J, Vartak R, Deng J, Bai Y. Mitochondrial respiratory complex I dysfunction promotes tumorigenesis through ROS alteration and AKT activation. *Hum Mol Genet* 2011; 20(23): 4605-16.