

Diss. ETH No. 17541

**Na<sup>+</sup>-translocating NADH:Quinone  
Oxidoreductases from *Vibrio cholerae* and  
*Yarrowia lipolytica***

A dissertation submitted to the  
SWISS FEDERAL INSTITUTE OF TECHNOLOGY ZÜRICH  
for the degree of  
Doctor of Sciences

presented by  
PO-CHI LIN  
Dipl. Natw. ETH Zürich

born May 7, 1978

citizen of Switzerland

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. M. Aebi, examiner  
Prof. Dr. H. Hilbi, co-examiner  
Prof. Dr. J. Fritz-Steuber, co-examiner  
Prof. Dr. P. Dimroth, co-examiner

Zürich, November 2007

## Zusammenfassung

NqrF, die NADH-oxidierende Untereinheit der Na<sup>+</sup>-transportierenden NADH:Q Oxidoreduktase (Na<sup>+</sup>-NQR) von *Vibrio cholerae*, enthält einen [2Fe-2S] Cluster. In dieser Studie wurde eine gekürzte Form (Fe-S Domäne) von NqrF verwendet, um die elektronischen Eigenschaften des Fe-S Zentrums zu untersuchen. Ein Vergleich der Aminosäuresequenz zeigte, dass die Sequenz des Fe-S Cluster-bindenden Motivs von der Fe-S Domäne konserviert und mit derjenigen von Ferredoxinen der Wirbeltierfamilie verwandt ist. Das binukleare Fe-S Cluster der Fe-S Domäne wurde von folgenden Cysteinen koordiniert: Cys<sup>70</sup>, Cys<sup>75</sup>, Cys<sup>79</sup> und Cys<sup>111</sup>. Das Null-Feld Mössbauer Spektrum der oxidierten Fe-S Domäne wurde bei 80 K aufgenommen und zeigte ein asymmetrisches Doublet mit einer Quadrupolsplaltung  $\Delta EQ = 0.613$  mm/s und einer Isomerverlagerung  $\delta = 0.283$  mm/s, die dem Fe(III)-Fe(III) Paar des binuklearen [2Fe-2S]<sup>2+</sup> Clusters zugeordnet wurden. Dieses Resultat wurde weiterhin durch den Fe- und S<sup>2-</sup>-Gehalt der Fe-S Domäne (jeweils  $1.61 \pm 0.28$  und  $1.31 \pm 0.11$  mol/mol Protein) unterstützt. Das temperaturabhängige magnetische Circular dichroismus-Spektrum von der photochemisch reduzierten Fe-S Domäne zeigte ein negatives Maximum bei 315 nm, das den Ladungsübergängen der Fe(II)-S Bindung zugeordnet wurde, und positive Maxima bei 358, 409, 554, 629 und 694 nm, die den Ladungsübergängen der Fe(III)-S Bindung zugeordnet wurden. Dieses Muster aus positiven und negativen Maxima ähnelte demjenigen des [2Fe-2S] Clusters von ISC-Typ Ferredoxinen, die in der Assemblierung von Fe-S Zentren eine Rolle spielen.

Die Na<sup>+</sup>-NQR von *V. cholerae* produziert extrazellulär reaktive Sauerstoffspezies (Superoxid und Wasserstoffperoxid), die zu der Pathogenität von *V. cholerae* durch oxidative Beschädigung der infizierten Wirtszellen beitragen könnten. In nativen, mit NADH reduzierten Membranen wurde ein organisches Radikal mit Hilfe der elektronenparamagnetischen Resonanzspektroskopie beobachtet und einem durch die Na<sup>+</sup>-NQR erzeugten Ubisemichinon zugeordnet. Die Ubisemichinonbildung wurde von Na<sup>+</sup> stimuliert; die Radikalkonzentration nahm von 0.2 mM bei 0.08 mM Na<sup>+</sup> auf 0.4 mM bei 14.7 mM Na<sup>+</sup> zu. Während der Atmung produzierte *V. cholerae* extrazelluläres Superoxid mit einer spezifischen Aktivität von  $10.2 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$ , während ein *V. cholerae*-Stamm ohne eine Na<sup>+</sup>-NQR nur eine Aktivität von  $3.1 \text{ nmol min}^{-1} \text{ mg}^{-1}$  aufwies. Wurde die Natriumkonzentration von 0.1 mM auf 5 mM erhöht, stieg die Rate der Superoxidbildung in *V. cholerae* um 70 % an. Diese Resultate zeigten, dass die extrazelluläre Natriumkonzentration

die Ubisemichinonbildung der  $\text{Na}^+$ -NQR stimulieren und hiermit die Produktion der reaktiven Sauerstoffspezies aus der Autooxidation des Chinols fördern könnte.

Ein anderes Familienmitglied der membrangebundenen NADH:Q Oxidoreduktasen ist der Komplex I der Atmungskette. Obwohl keine Sequenz- oder Strukturhomologie besteht, setzen  $\text{Na}^+$ -NQR und Komplex I beide die aus Redoxreaktion gewonnene Energie in Kationentransport um. Unsere Studie zeigte, dass die NADH-Oxidation von submitochondrialen Partikeln aus der Hefe *Yarrowia lipolytica* mit der protonophor-resistenten Natriumaufnahme ( $0.12 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) gekoppelt wurde, was die Präsenz einer redox-getriebenen funktionsfähigen Primärnatriumpumpe in der inneren mitochondrialen Membran andeutet. Durch Reinigung und Rekonstitution in Proteoliposomen wurde eine NADH Dehydrogenase identifiziert, die NADH-abhängige Reduktion des Ubichinons ( $1.4 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) mit Natriumtransport ( $2.0 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ ) koppelte. Der NADH-getriebene Natriumtransport konnte durch Rotenon gehemmt werden. Rotenon ist ein spezifischer Komplex I Inhibitor, und daraus folgern wir, dass Mitochondrien von *Y. lipolytica* eine NADH-getriebene Natriumpumpe enthalten. Wir schlagen vor, dass sie dem Komplex I der Atmungskette entspricht. Unsere Studie zeigt, dass die Energienutzung der Mitochondrien nicht nur auf dem Protonengradienten („proton motive force“) beruht, sondern dass ein durch Komplex I aufgebauter elektrochemischer Natriumgradient von Nutzen sein könnte.

## Summary

NqrF, the NADH oxidizing subunit of the Na<sup>+</sup>-translocating NADH:Q oxidoreductase (Na<sup>+</sup>-NQR) from *Vibrio cholerae*, contains a [2Fe-2S] cluster. Here we used a truncated version (Fe-S domain) of NqrF to study the electronic properties of the Fe-S center. A comparison of the amino acid sequence of the Fe-S domain showed that the sequence of Fe-S cluster binding motif is conserved and related to ferredoxins of the vertebrate-type family. The binuclear Fe-S cluster is coordinated by the cysteine residues Cys<sup>70</sup>, Cys<sup>76</sup>, Cys<sup>79</sup> and Cys<sup>111</sup>. The zero-field Mössbauer spectrum of the oxidized Fe-S domain recorded at 80K showed an asymmetric doublet with a quadrupole splitting  $\Delta EQ = 0.613$  mm/s and an isomer shift  $\delta = 0.283$  mm/s which were assigned to the Fe(III)-Fe(III) pair of the binuclear [2Fe-2S] cluster. This result was further supported by the Fe and S<sup>2-</sup> content of the Fe-S domain ( $1.61 \pm 0.28$  and  $1.31 \pm 0.11$  mol/mol protein, respectively). The variable temperature magnetic circular dichroism (VTMCD) spectrum of the photochemically reduced Fe-S domain revealed a negative band at 315 nm assigned to Fe(II)-S charge transitions and positive bands at 358, 409, 554, 629 and 694 nm assigned to Fe(III)-S charge transitions. This pattern of positive and negative bands resembles those of the [2Fe-2S] clusters found in the ISC-type ferredoxins. We conclude that the [2Fe-2S] cluster in the isolated Fe-S domain of NqrF is very similar to the 2Fe-clusters from vertebrate-type ferredoxins and among these is mostly related to the [2Fe-2S] cluster present in the ISC-type ferredoxins.

Na<sup>+</sup>-NQR from *V. cholerae* generates extracellular reactive oxygen species, such as superoxide and hydrogen peroxide, which may contribute to the pathogenicity of *V. cholerae* by causing oxidative damages to the infected host cells. Upon reduction with NADH, an organic radical was detected in native membranes by electron paramagnetic resonance spectroscopy which was assigned to ubisemiquinone generated by the Na<sup>+</sup>-NQR. The formation of ubisemiquinone was stimulated by Na<sup>+</sup>; the concentration of radical increased from 0.2 mM at 0.08 mM Na<sup>+</sup> to 0.4 mM at 14.7 mM Na<sup>+</sup>. During respiration *V. cholerae* produced extracellular superoxide with a specific activity of 10.2 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup> in the wild-type strain, whereas the Na<sup>+</sup>-NQR-depleted strain had only a specific activity of 3.1 nmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>. Raising the Na<sup>+</sup> concentration from 0.1 mM to 5 mM increased the rate of superoxide formation in the wild-type strain by at least 70 %. These results showed that extracellular Na<sup>+</sup> concentration could stimulate ubisemiquinone formation by the Na<sup>+</sup>-NQR

and hereby enhance the production of reactive oxygen species formed during the autooxidation of reduced quinone.

Another family member of membrane-bound NADH:Q oxidoreductases is the respiratory complex I. Although sharing no sequential or structural homology both Na<sup>+</sup>-NQR and complex I convey the energy gained from the redox reaction to translocate cation across the membrane. Our study showed that oxidation of NADH by submitochondrial particles from the yeast *Yarrowia lipolytica* is coupled to protonophore-resistant Na<sup>+</sup> uptake (0.12 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>), indicating that a redox-driven primary Na<sup>+</sup> pump is operative in the inner mitochondrial membrane. By purifying and reconstitution into proteoliposomes, a respiratory NADH dehydrogenase was identified which coupled NADH-dependent reduction of ubiquinone (1.4 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>) to Na<sup>+</sup> translocation (2.0 μmol min<sup>-1</sup> mg<sup>-1</sup>). NADH-driven Na<sup>+</sup> transport was sensitive towards rotenone, a specific inhibitor of complex I. We conclude that mitochondria from *Y. lipolytica* contain a NADH-driven Na<sup>+</sup> pump and propose that it represents the complex I of the respiratory chain. Our study indicates that energy conversion by mitochondria does not exclusively rely on the proton motive force but may benefit from the electrochemical Na<sup>+</sup> gradient established by complex I.