



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.152.193*1

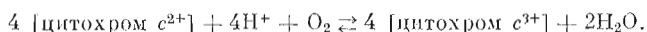
СТРОЕНИЕ И СВОЙСТВА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Филатов И. А., Гулиш М. А., Миронов А. Ф.

Московский институт тонкой химической технологии им. М. В. Ломоносова

Обзор включает современные данные о способах выделения и очистки цитохром-оксидазы, а также отдельных субъединиц фермента. Особое внимание уделяется расположению фермента в мембране, субъединичному составу и взаимному расположению субъединиц, локализации протетических групп и взаимодействию цитохромоксидазы с цитохромом *c*.

Цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1) представляет собой важнейший фермент, катализирующий восстановление кислорода в цепи окислительного фосфорилирования. Его функция состоит в передаче четырех электронов, поступающих по дыхательной цепи, через цитохром *c* молекуле кислорода:



Участие цитохромоксидазы в создании мембранного потенциала свидетельствует о важной роли фермента в энергетических процессах живых организмов. Цитохромоксидаза необходима для жизнедеятельности любых аэробных клеток. У эукариот фермент располагается во внутренней мембране митохондрий, у прокариот — в плазматической мембране.

В последние годы цитохромоксидаза подвергается интенсивному изучению. Со времени опубликования обзора [1] появилось значительное количество фактического материала, уточняющего представления о ферменте, его структуре и механизме действия.

Несмотря на то что в последнее время появился ряд обзорных работ по цитохромоксидазе [2—6], вопросы, связанные с изучением строения фермента, его взаимодействия с цитохромом *c* и кислородом, остаются в центре внимания исследователей.

В настоящем обзоре представлены данные по исследованию цитохромоксидазы, в первую очередь с точки зрения изучения строения этого сложного белка, его топографии и взаимодействия с биомембранами и липидами.

1. ВЫДЕЛЕНИЕ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

1.1. Общее представление о ферменте

Цитохромоксидаза высших организмов располагается во внутренней митохондриальной мембране и представляет собой сложный белковый комплекс. В состав цитохромоксидазы входят также два гема *a* и два иона меди.

Отличительной особенностью гема *a* (рис. 1) является наличие в порфириновом цикле формильной группы в положении 18 и ненасыщенного изопреноидного спирта в положении 3.

Железо гемов цитохромоксидазы может находиться как в восстановленном, так и в окисленном состояниях и координироваться с одним или двумя лигандами, расположенными перпендикулярно плоскости порфирина. В зависимости от белкового окружения гемы цитохромоксидазы раз-

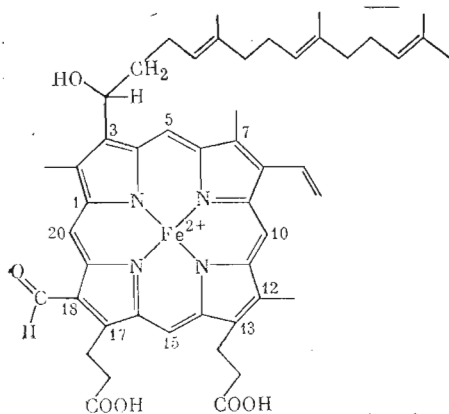


Рис. 1. Гем *a* — простетическая группа цитохромоксидазы. Нумерация атомов дана в соответствии с рекомендациями номенклатурной комиссии IUPAC — IUB (Eur. J. Biochem. 1980. V. 108. P. 1—30)

цитохромоксидазу из 5 субъединиц (соя, батат), 7—8 субъединиц (*Saccharomyces cerevisiae*, *Neurospora crassa*). У млекопитающих число субъединиц фермента возрастает до 12—13. Три наиболее крупные субъединицы (1—III) цитохромоксидазы эукариот кодируются митохондриальной ДНК и синтезируются на митохондриальных рибосомах. Остальные субъединицы кодируются ядерной ДНК и синтезируются в цитоплазме [2].

Вопрос о действительной принадлежности малых полипептидов к цитохромоксидазе до сих пор не решен [6]. В связи с этим невозможно определить точную молекулярную массу фермента. Прочная ассоциация цитохромоксидазы с липидами и детергентами также затрудняет такое определение. Тем не менее считают [4], что молекулярная масса фермента в активной форме составляет 200 000.

1.2. Выделение фермента

Цитохромоксидаза является мембранным ферментом. Все процессы ее выделения основаны на использовании детергентов и включают три этапа: экстракцию сопутствующих белков при низкой концентрации детергента, экстракцию цитохромоксидазы при более высокой концентрации детергента и очистку фермента. При этом используют как ионные (холат, дезоксихолат натрия), так и неионные детергенты (третон X-100, X-114, лаурилмальтозид). Наибольшее распространение получили холат и дезоксихолат натрия, что связано с более простым удалением их из препаратов фермента [7].

Применение ступенчатой солюбилизации, при которой сначала экстрагируются белки, менее прочно связанные с мембраной (например, цитохромредуктазный комплекс), упрощает процесс выделения и облегчает дальнейшую очистку цитохромоксидазы [8, 9]. Классическим методом очистки фермента является многократное фракционирование сульфатом аммония [9—11]. При этом в зависимости от концентрации присутствующего детергента получают препараты цитохромоксидазы с высоким или низким содержанием фосфолипидов [12, 13].

Несмотря на кажущуюся простоту, классический метод требует от экспериментатора определенного искусства и поэтому недостаточно хорошо воспроизводим (содержание гема *a* в конечном препарате фермента колеблется от 7 до 11 нмоль/мг белка). Кроме того, методу присущи значительные потери фермента и, как следствие, низкий выход.

В последние годы для очистки цитохромоксидазы широкое применение нашли различные хроматографические методы.

личаются по свойствам. Один, обычно находящийся в высокоспиновом состоянии, реагирует после восстановления с кислородом и лигандами и обозначается как гем *a₃*. Другой, гем *a*, является низкоспиновым и не реагирует с лигандами.

Ионы меди в цитохромоксидазе также неравноценны. Один из них, Cu_A, дает сигнал в спектре ЭПР и взаимодействует с гемом *a*, другой не дает сигналов, взаимодействует с гемом *a₃* и обозначается Cu_B.

Апофермент состоит из нескольких полипептидных цепей, количество которых зависит от эволюционной ступени, занимаемой организмом. Фермент прокариот, например *Thermus thermophilus* HB 8 и *Paracoccus denitrificans*, состоит из 2—3 субъединиц. Эукариоты содержат

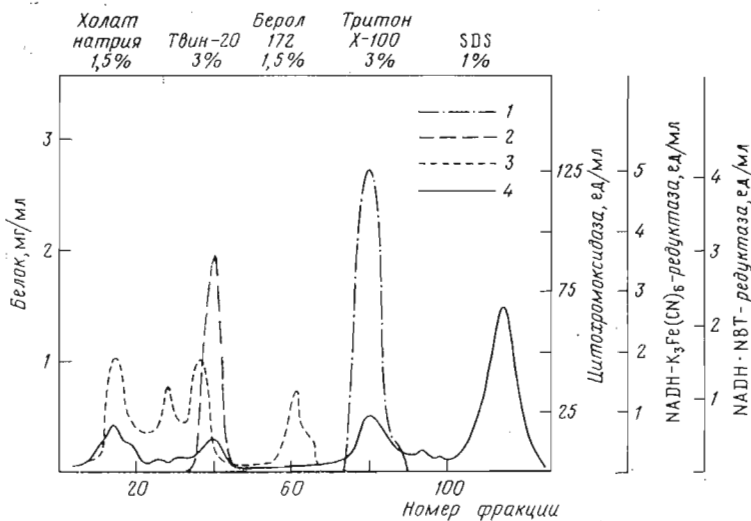


Рис. 2. Выделение цитохромоксидазы методом гидрофобной хроматографии [21]. Сорбент — фенолсефароза. Элюция ступенчатая с помощью детергентов, указанных на рисунке сверху. Активность цитохромоксидазы (1), NADH-K₃Fe(CN)₆-редуктазы (2), NADH·NBT-редуктазы (3) (NBT — nitroblue tetrazolium). Содержание белка в элюате (4)

Ионообменная хроматография. Поскольку изоэлектрическая точка цитохромоксидазы соответствует значению pH 5,6, в условиях низкой ионной силы фермент хорошо сорбируется на ионообменных смолах с положительно заряженными группировками. Использование хроматографии на DEAE-целлюлозе (DEAE-агарозе) в сочетании с классическим методом очистки позволило получить препараты фермента с низким содержанием липидов и 9,0—9,5 нмоль гема *a*/мг белка [14—17]. В работах [18, 19] анионообменная хроматография была использована для получения цитохромоксидазы без субъединицы III. Процесс включал в себя предварительное инкубирование фермента в буфере с высоким значением pH.

Гидрофобная хроматография. Метод, основанный на взаимодействии цитохромоксидазы с гидрофобными сорбентами, описан в работе [20]. После однократного переосаждения с сульфатом аммония препарат фермента из сердца быка наносили на колонку с октилсефарозой и промывали сначала буфером, содержащим 10% холата натрия, затем 1,5% твина-80. При элюировании буфером с 1% тритона X-100 с колонки выходил концентрированный раствор цитохромоксидазы (~ 40 мг белка/мл) с чистой фермента в пиковой фракции 10 нмоль гема *a*/мг белка и очень низким содержанием липидов (~ 0,2%).

Подробное изучение метода выделения цитохромоксидазы из печени крысы с помощью гидрофобной хроматографии было проведено в работе [21]. При использовании различных агарозных гелей с алкильными и аминоалкильными группами максимальная адсорбция фермента наблюдалась в случае заместителей, содержащих восемь углеродных атомов. Однако самая высокая адсорбция цитохромоксидазы обнаружена на фенолсефарозе (рис. 2), которая по своей гидрофобности уступает даже бутилсефарозе. Вероятно, это связано с взаимодействием остатков ароматических аминокислот фермента с сорбентом. Применение гидрофобной хроматографии позволяет значительно сократить процесс выделения цитохромоксидазы. В работе [22] из частиц Кейлина — Хартри фермент экстрагировали холатом натрия, осаждали часть примесных белков сульфатом аммония, и раствор, обогащенный цитохромоксидазой (5,5—6,5 нмоль гема *a*/мг белка), наносили на колонку (1,6 × 40 см) с октилсефарозой. Колонку промывали 1,5% холатом натрия в 0,05 М фосфатном буфере (pH 7,4) и затем элюировали 1% тритоном X-100 (скорость 1 мл/мин). Выделенный препарат содержал 9,0—9,3 нмоль гема *a*/мг белка, 2—3% фосфолипидов и имел активность 120 моль цитохрома *c*/(моль цитохром-

оксидазы с) в присутствии 0,5% твина-80. Процесс выделения цитохром-оксидазы из частиц Кейлина — Хартри занимал в данном случае 15 ч.

Благодаря высокой емкости сорбентов, простоте и хорошей воспроизводимости метода гидрофобная хроматография часто применяется в последнее время для очистки цитохромоксидазы после выделения фермента из различных источников, таких, как сердце быка [22, 23], печень лягушки [24], печень мыши [25], дрожжи [26].

Аффинная хроматография. Первые сорбенты для аффинной хроматографии цитохромоксидазы, полученные при иммобилизации цитохрома с сердца лошади на сефарозе, предварительно обработанной бромцианом, имели низкую удельную емкость [27, 28]. Это, по-видимому, было связано с тем, что значительное число ϵ -аминогрупп остатков лизина цитохрома с, обеспечивающих взаимодействие его с цитохромоксидазой, оказалось ковалентно связанным с сефарозой [29]. Поэтому в последующих работах [30] использовали цитохром с из дрожжей, который в отличие от цитохрома с млекопитающих имеет в своем составе остаток цистеина (Cys-107). Сульфгидрильная группа последнего была использована для связывания с сефарозой. На таком сорбенте осуществлен одностадийный процесс очистки цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка. Каждый препарат фермента содержал ~ 9 нмоль гема *a*/мг белка [30].

Иной подход был продемонстрирован в работах [31—33]. Авторы также работали с сефарозой, активированной бромцианом, но, для того чтобы избежать многоточечного связывания цитохрома с с активированным сорбентом, часть реакционных центров сефарозы предварительно гидролизовали. На полученной таким образом цитохром-с-сефарозе была проведена предварительная очистка цитохромоксидазы из *N. crassa* [32] и осуществлен одностадийный процесс выделения фермента из сердечной мышцы быка [33]. В последней работе отмечалось, что при использовании лаурилмальтозида препарат цитохромоксидазы получают более активным и чистым (9,0—9,5 нмоль гема *a*/мг белка), чем при использовании тритона X-100 (7 нмоль гема *a*/мг белка).

Несмотря на примеры успешного применения аффинной хроматографии для выделения цитохромоксидазы, этот метод имеет ряд недостатков. К ним относится сложность приготовления аффинного сорбента и его малая емкость (2—4 мг белка с 20 мл сорбента). Кроме того, цитохромоксидаза элюируется с колонки в виде очень разбавленного раствора ($\sim 0,1$ мг белка/мл), что создает определенные трудности при дальнейшей работе с ферментом.

Использование антител для очистки цитохромоксидазы [6]. Попытки применения антител для аффинной очистки цитохромоксидазы оказались неудачными. Это связано с недостаточной чистотой фермента, который был использован для выработки антител. Кроме того, антитела, полученные для цитохромоксидазы, очищенной с помощью электрофореза в ПААГ, не оказались достаточно эффективными, что объясняют переменным субъединичным составом фермента в растворе в присутствии детергента. С другой стороны, использование в качестве антигенов для выработки антител отдельных полипептидов фермента также оказалось малоэффективным.

1.3. Критерии чистоты цитохромоксидазы

Обычно чистоту фермента выражают через отношение содержания гема *a* в наномолях к количеству белка в миллиграммах. Для препаратов цитохромоксидазы, выделенных в различных условиях, этот показатель составляет 8—14 нмоль гема *a*/мг белка. Определить теоретически точное значение этой величины пока невозможно, так как отсутствуют точные данные о числе субъединиц, действительно входящих в фермент. Однако при молекулярной массе фермента 200 000 этот показатель равен 10,0.

Теоретическая молекулярная масса фермента, рассчитанная как сумма молекулярных масс 13 отдельных субъединиц, равна 210 000 (9,5 нмоль гема *a*/мг белка), а как сумма молекулярных масс 8 наиболее крупных полипептидов — 166 000 (12,0 нмоль гема *a*/мг белка) [2].

Следует отметить, что значительное уменьшение молекулярной массы в некоторых препаратах фермента может быть связано с потерей части субъединиц или с неточным определением содержания гема *a* и белка. Действительную молекулярную массу цитохромоксидазы и соотношение гема *a* — белок еще предстоит определить. По-видимому, это можно будет сделать на препарате, полученном путем диссоциации фермента на отдельные субъединицы с последующей ассоциацией необходимых субъединиц в активную цитохромоксидазу.

Важной характеристикой выделенного фермента является его активность, которая определяется либо спектрофотометрически (по уменьшению поглощения ферроцитохрома *c* под действием цитохромоксидазы), либо полярографически (по изменению концентрации кислорода в среде) и может достигать величины 400 моль цитохрома *c*/(моль цитохромоксидазы·с).

Активность цитохромоксидазы сильно зависит от количества липидов, которые достаточно трудно отделить при выделении фермента. Во многих случаях липиды в препаратах цитохромоксидазы составляют ~20% по весу. Применение для очистки хроматографических методов позволяет снизить их содержание до 0,2%. Это, однако, приводит к уменьшению ферментативной активности, которая при добавлении липидов частично восстанавливается. Имеются данные, позволяющие проследить изменение активности цитохромоксидазы на всех стадиях выделения и очистки [34]. На их основе можно сделать вывод, что при уменьшении содержания липидов, вероятно, происходит агрегация белка, изменение конформации или структуры фермента, что сопровождается снижением его активности.

2. СУБЪЕДИНИЦЫ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

2.1. Методы разделения субъединиц фермента

Активное изучение полипептидов цитохромоксидазы началось с появлением метода гель-электрофореза в присутствии додецилсульфата натрия (SDS) [35, 36]. С этого времени представления о структуре цитохромоксидазы претерпели значительные изменения. Количество полипептидов, обнаруженных в препаратах фермента млекопитающих, увеличивалось с 3 [37] до 5 [28], 6 [15, 38], 7 [21, 39—42], 8 [43], 9 [44, 45] и, наконец, до 12—13 [46—48]. Наилучшее деление субъединиц с помощью гель-электрофореза [48] было достигнуто благодаря применению высокой концентрации акриламида (19%), введению мочевины в разделяющий гель и использованию буферной системы Лэммли [49].

Следует отметить, что принятые в разных лабораториях обозначения субъединиц, основанные на различиях в их электрофоретической или хроматографической подвижности, часто не совпадают. Сравнение трех наиболее распространенных номенклатур приведено на рис. 3.

Электрофорез в полиакриламидном геле в присутствии SDS был использован для препаративного выделения полипептидов цитохромоксидазы [16, 53, 54]. Однако удовлетворительные результаты были получены лишь в отношении субъединиц I и II [54]. Субъединица V с высокой степенью чистоты (гомогенность 99%) была выделена с помощью препаративного изоэлектрофокусирования [55].

Наилучшее хроматографическое разделение субъединиц цитохромоксидазы было получено при гель-фильтрации на биогеле P-60 [54, 56] и ультрогеле AcA-54 [54, 57] в присутствии SDS (рис. 4). Главным условием успешного разделения полипептидов является низкое содержание фосфолипидов и холата натрия в препарате фермента, высокая концентрация SDS в буфере (2—3%) и очень низкая скорость перемещения фермента по колонке (0,2—0,75 см/ч) [54]. Несмотря на хорошую картину одностадийного хроматографического разделения, лишь субъединицы I, II и IV были получены в сравнительно чистом состоянии, остальные полипептиды нуждались в дополнительной очистке.

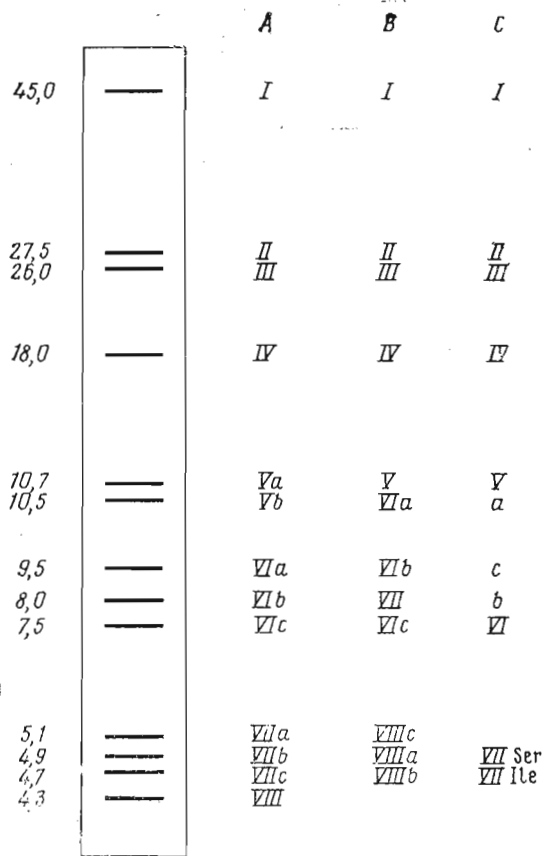


Рис. 3. Схема электрофоретического разделения субъединиц цитохромоксидазы из сердца быка [46, 50]. Слева указаны значения молекулярных масс (кДа), соответствующие субъединицам, справа — наиболее распространенные системы их обозначения, основанные на различиях в их электрофоретической (A [46], B [51]) и хроматографической (C [52]) подвижностях

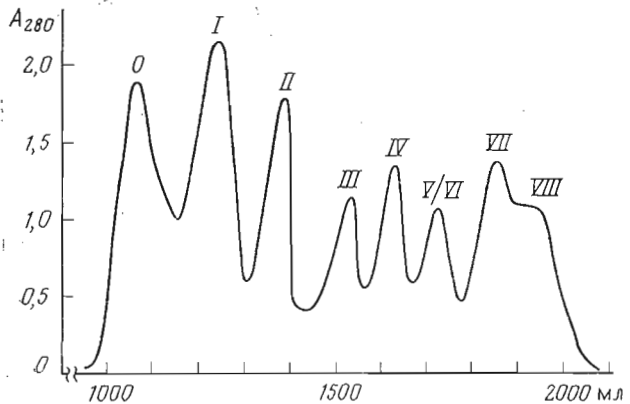


Рис. 4. Хроматографическое разделение субъединиц фермента на колонке с ультрогелем AcA-54 [57]. Цифрами обозначены номера субъединиц. 0 — агрегаты гидрофобных полипептидов

Применение высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ; колонка TSK-3000 SW) позволяет ускорить процесс разделения, однако в чистом виде удается выделить лишь отдельные полипептиды [58].

Метод препаративного выделения пяти субъединиц фермента, включающий экстракцию водными растворами пиридина, различного рода

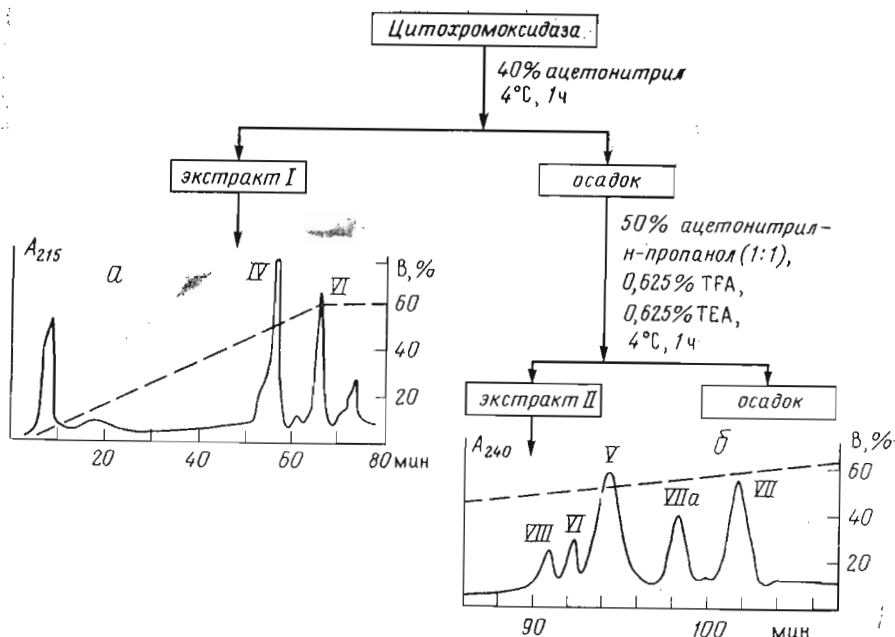


Рис. 5. Выделение субъединиц IV—VIII цитохромоксидазы дрожжей [26]. Разделение экстрактов I (а) и II (б) проводили с помощью ВЭЖХ на колонке с обращенной фазой. Буфер А — 5% ацетонитрил, 0,05% трифторуксусная кислота (ТФА), 0,05% триэтил-амин (ТЕА) (а, б); буфер В — ацетонитрил, содержащий 0,05% ТФА и 0,05% ТЕА (а) или ацетонитрил — *n*-пропанол (1 : 1), содержащий 0,05% ТФА и 0,05% ТЕА (б). Пунктирной линией показано изменение концентрации буфера В в буфере А

фракционирование, а также хроматографию, был предложен в работе [59]. Хорошие результаты получены при разделении субъединиц фермента цитоплазматического происхождения из *Saccharomyces cerevisiae* [26, 60]. Авторы использовали ступенчатую экстракцию полипептидов полярными органическими растворителями. На заключительном этапе применена ВЭЖХ на обращенной фазе (рис. 5). Метод позволил разделить субъединицы VIIa и VII, которые представляют собой общую зону в гель-электрофорезе высокого разрешения [52].

2.2. Стехиометрия субъединиц цитохромоксидазы

Для определения молярного соотношения полипептидов цитохромоксидазы были использованы различные методы. Так, например, в работе [56] субъединицы фермента выделяли с помощью хроматографических методов, после чего проводили количественный N-концевой аминокислотный анализ полипептидов. Кроме того, сравнивали как общее содержание аминокислот, так и поглощение отдельных субъединиц при 280 нм (основываясь на известном количестве остатков триптофана и тирозина [57]). В обоих случаях было найдено, что все 12 полипептидов находятся в эквимольном соотношении. Однако позже авторы пересмотрели свои результаты и пришли к выводу, что полипептид VIIlb (по номенклатуре [51]) присутствует в ферменте в двойном количестве [51].

Для определения стехиометрии субъединиц цитохромоксидазы использован также метод, основанный на измерении флуоресценции меченых флуорескаминон аминокислот, полученных при гидролизе электрофоретических белковых зон [46]. Было установлено, что все 12 компонентов находятся в эквивалентном соотношении. Аналогичные результаты получены на основании анализа аминокислотного состава и распределения радиоактивного лейцина между субъединицами для семи полипептидов цитохромоксидазы из *N. crassa* [53, 62].

В работе [63] все лизиновые и N-концевые аминокислотные остатки денатурированной цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка были поме-

чены [^{14}C]метилацетимидатом. После разделения полипептидов и определения радиоактивности оказалось, что молярное количество субъединицы III примерно вдвое ниже, чем остальных полипептидов. Однако этот факт, по-видимому, объясняется потерей значительного количества субъединицы III при выделении фермента, а не реальным соотношением полипептидов [6].

При изучении цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка было замечено, что полипептиды *b* и *c* (по номенклатуре [52], рис. 3) часто присутствуют в препаратах фермента менее чем в эквимольном количестве [39]. Кроме того, они могут быть полностью удалены с помощью анионообменной хроматографии при высокой концентрации тритона X-100 [64] либо при ограниченном протеолизе [65], причем фермент сохраняет активность. На основании этого был сделан вывод, что полипептиды *b* и *c* являются примесными белками [2]. Однако более тщательный анализ, проведенный другой группой исследователей, показал, что обработанный трипсином фермент имеет пониженное сродство к цитохрому *c* и повышенную $V_{\text{макс}}$ [50] ферментативной реакции. Таким образом, не являясь непосредственно включенными в электронный перенос от цитохрома *c* к кислороду, субъединицы *b* и *c* могут влиять на кинетические параметры процесса, выполняя регулярную функцию *in vivo*. В той же работе [50] дается следующее возможное объяснение меньших количеств полипептидов *b* и *c* в препаратах цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка: 1) во время выделения фермента некоторые протеиназы, присутствующие в митохондриальной фракции, могут специфически расщеплять эти субъединицы; 2) связь субъединиц *b* и *c* с комплексом может быть значительно слабее в случае фермента из сердечной мышцы быка по сравнению с цитохромоксидазой из других источников.

Остается открытым вопрос о наличии в составе фермента млекопитающих полипептида VIII (по номенклатуре [46]). Этот полипептид с наименьшей наблюдаемой молекулярной массой был обнаружен Каденбахом с сотрудниками в препаратах цитохромоксидазы из печени крысы [46] и быка [50]. Однако существование данного белка до сих пор не было подтверждено другими исследователями.

2.3. Первичная структура субъединиц

В последние годы проведена большая работа по установлению первичной структуры полипептидов цитохромоксидазы. Наибольший вклад в этой области был сделан группой немецких исследователей во главе с проф. Бузе [52, 66—72]. Была определена аминокислотная последовательность 8 из 12 субъединиц фермента сердечной мышцы быка. Анализ полипептидов включал фрагментацию белков с использованием бромциана, трипсина, 2-иодосилбензойной кислоты, протеиназы V8 из *Staphylococcus aureus* и других реагентов, разделение фрагментов методом гель-фильтрации на биогелях, деградацию очищенных пептидов по Эдману. Для установления природы N-концевой блокирующей группы в субъединице VII был применен масс-спектрометрический метод [73].

Первичная структура двух самых больших полипептидов цитохромоксидазы (I и III) была определена при секвенировании кодирующих их митохондриальных ДНК [74]. Аминокислотный состав и молекулярная масса субъединиц приведены в табл. 1.

В результате анализа аминокислотной последовательности субъединиц фермента было установлено, что шесть наиболее крупных полипептидов имеют в своем составе по одному гидрофобному участку, способному (за исключением участка субъединицы VI с [70]) в виде α -спирали пронизывать фосфолипидный бислой, причем субъединица II образует 2 трансмембранных тяжа, а в субъединицах I и III предполагается наличие 10—12 и 6—7 трансмембранных фрагментов соответственно.

Сравнение первичной структуры субъединиц цитохромоксидазы из различных источников и установление гомологии с другими гем-

Субъединицы цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка

Обозначение полипептида [51]	Число остатков аминокислот в молекуле	Молекулярная масса	Литературный источник
I *	514	56 993	[74]
II *	227	26 049	[66]
III	261	29 918	[74]
IV	147	17 153	[67]
V	109	12 436	[75]
VIa	98	10 670	[68]
VIb	84	9 419	[69]
VIc	73	8 480	[70]
VII **	85	10 068	[71]
VIIIa	47	5 441	[52]
VIIIb	46	4 962	[72]
VIIIc	56	6 244	[61]

* N-Конец блокирован формильной группой.

** N-Конец блокирован ацетильной группой.

и медьсодержащими белками позволило с высокой степенью вероятности определить участки локализации металлоцентров в кодируемых митохондриальной ДНК полипептидах I и II, являющихся, следовательно, каталитически важными. Роль субъединиц, синтезируемых в цитоплазме, до сих пор неясна, но, по-видимому, они также важные компоненты цитохромоксидазы. Этот вывод был сделан в работе [76] на основании консервативности первичных структур этих субъединиц в ферменте из сердца быка, дрожжей и *N. crassa*, которая составляет 30—50%, т. е. примерно столько же, сколько в полипептидах I и II.

3. ТОПОЛОГИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

3.1. Размеры и форма фермента

Значительный вклад в изучение строения цитохромоксидазы был внесен с помощью методов электронной микроскопии и дифракции рентгеновских лучей [77—83]. Сравнение двух кристаллических форм фермента, полученных разными способами из митохондрий сердечной мышцы быка, приведено в табл. 2. Схематическое изображение везикулярных кристал-

Таблица 2

Сравнение двух кристаллических форм цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка [79]

Свойства	Форма I	Форма II
Использованный детергент	Тритон X-100, X-114	Дезоксихолат натрия
Форма белка	Димер	Мономер
pH-стабильность	6,5—7,8	7,5—9,2
Содержание липидов, мг/мг белка	0,3—0,4	0,13—0,17
Толщина, Å	200	110
Площадь элементарной ячейки, Å ²	12 400	11 832
Количество мономеров в элементарной ячейке	4	2
Структура	Сплюснутые везикулы с непрерывным блином	Пластинки, обогащенные детергентом
Ориентация по отношению к водной фазе	Матриксная сторона	Обе стороны

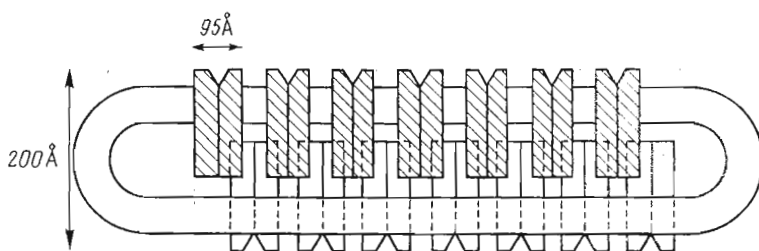


Рис. 6. Схематическое изображение везикулярных кристаллов цитохромоксидазы [78]. Незаштрихованные молекулы повернуты на 180° по отношению к заштрихованным

лов цитохромоксидазы (форма I), а также пространственная модель мономера фермента, построенная на основании данных, полученных при изучении кристаллической формы (II), показаны на рис. 6 и 7.

Было установлено, что С-домен фермента выступает с цитоплазматической стороны мембраны на $50\text{--}55\text{ \AA}$. Непосредственно под поверхностью матриксной стороны мембраны С-домен разделяется на два М-домена, которые проходят сквозь липидный бислой и выступают на $15\text{--}25\text{ \AA}$ со стороны матрикса. При изучении фермента с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния [2] было показано, что М-домены представляют собой «связки» спиралей, перпендикулярных бислою. М1-домен с площадью сечения $\sim 900\text{ \AA}^2$ может содержать $8\text{--}12$ спиралей, а меньший М2-домен ($\sim 650\text{ \AA}^2$) — $5\text{--}8$ спиралей. Оба домена окружены фосфолипидами, расстояние между их центрами составляет $\sim 40\text{ \AA}$. В димере фермента контакт осуществляется через С-домены мономеров. Внутри бислоя наиболее близко располагаются М2-домены мономеров ($\sim 36\text{ \AA}$ между центрами), причем было найдено, что в этих доменах находится субъединица IV (на расстоянии $\sim 20\text{ \AA}$ от центра димера) [84, 85].

К сожалению, максимальное разрешение, достигнутое при изучении кристаллических форм цитохромоксидазы, составляет 20 \AA , что не позволяет получить информацию о третичной структуре полипептидов фермента. Для идентификации аминокислотных остатков требуется разрешение не менее 3 \AA .

3.2. Взаимное расположение субъединиц цитохромоксидазы

Наиболее простым методом определения взаимного расположения полипептидов в многокомпонентном белке является химическая сшивка. Интерпретация полученных результатов значительно облегчается при использовании реагентов, способных к расщеплению, которое проводят после разделения белков со сшитыми субъединицами. При этом в качестве метода разделения применяется двухмерный электрофорез. После осуществления сшивки ковалентно связанные и непрореагировавшие полипептиды разделяют в первом направлении, инкубируют гель в растворе расщепляющего соединения (в случае применения реагентов, содержащих дисульфидный мостик, это меркаптоэтанол, в случае производных винной кислоты — периодат), после чего проводят электрофорез в другом направлении.

Суммированные данные химической сшивки субъединиц цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка тремя реагентами: дитиобиссукцинимидилпропионатом, диметил-3,3'-дитиобиспропионимидатом и N,N-бис-(сукцинимидилоксикарбонилпропил)тарtratом показаны на рис. 8 [86, 87]. Цитохромоксидазу из печени крысы также изучали с помощью первых двух названных реагентов. Применение гель-электрофореза высокого разрешения позволило построить модель, показанную на рис. 9 [88]. Была предпринята попытка использования медного комплекса ди(1,10-фенантролина) для создания дисульфидной связи непосредственно между соседними цистеинсодержащими субъединицами. Однако применение это-

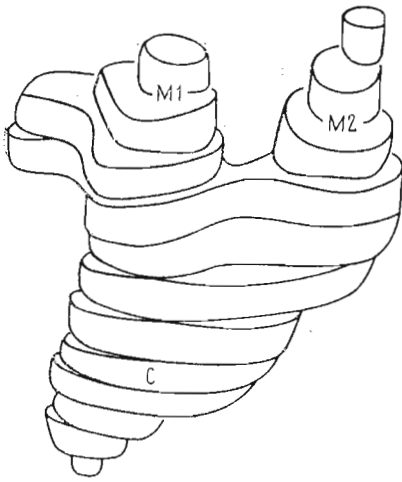


Рис. 7

Рис. 7. Модель мономера цитохромоксидазы. Домены M1 и M2 расположены с матричной стороны мембраны, а домен С — с цитоплазматической [79]

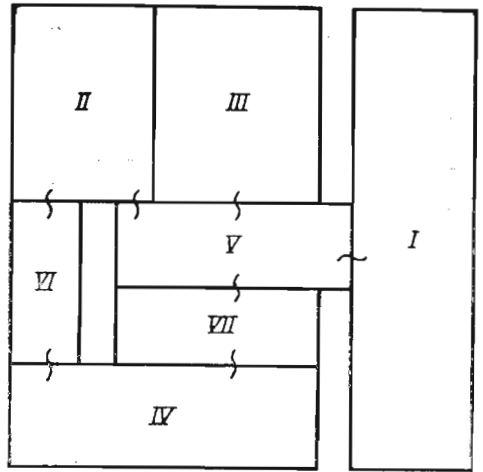


Рис. 8

Рис. 8. Схема взаимного расположения субъединиц цитохромоксидазы из сердца быка [87]. Знаком (~) показаны сшивки полипептидов

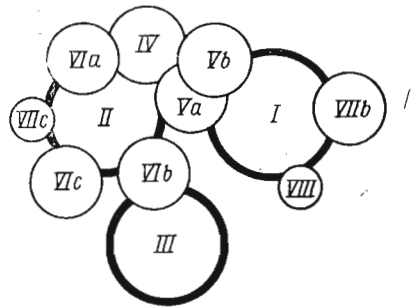


Рис. 9

Рис. 9. Схема взаимного расположения субъединиц цитохромоксидазы из печени крысы [88]. Жирной линией показаны субъединицы, синтезируемые в митохондриях

го реагента привело к образованию всех теоретически возможных пар, что свидетельствовало о полном нарушении нативной структуры фермента.

В качестве бифункционального реагента был использован также 1,5-дифтор-2,4-динитробензол [89]. По данным электрофореза сделан вывод об образовании связи между субъединицами III и VI цитохромоксидазы из сердечной мышцы быка.

Наряду с применением сшивающих бифункциональных реагентов для изучения топографии цитохромоксидазы использовались различные модифицирующие и расщепляющие агенты. Модифицирующие реагенты приведены в табл. 3. Описано также использование антител, специфичных к отдельным субъединицам фермента [41, 55, 77].

Применение перечисленных реагентов позволило определить субъединицы, выступающие из липидного бислоя либо со стороны матрикса, либо со стороны цитозоля, и расположение фермента относительно липидного бислоя.

Эксперименты проводили как на неориентированных молекулах цитохромоксидазы (очищенный фермент в мицеллах детергентов), так и на ориентированных (в митохондриях и митопластах фермент доступен с цитоплазматической стороны, а в субмитохондриальных частицах — со стороны матрикса). В работе [96] были получены искусственные фосфолипидные везикулы, в которых 80% встроенных молекул цитохромоксидазы имели цитоплазматическую ориентацию.

На основе анализа многочисленных данных, полученных с применением модифицирующих и сшивающих реагентов, в 1983 г. [2] была предложена модель расположения субъединиц в цитохромоксидазе (рис. 10).

Следует отметить, что в данной модели авторы основывались на представлениях о цитохромоксидазе, содержащей семь полипептидов. В связи с этим расположение субъединиц V—VII нельзя считать определенным,

Модифицирующие реагенты, применяемые для изучения топографии полипептидов цитохромоксидазы

№ п.п.	Название	Тип	Метод регистрации	Литературный источник
1	Иодид натрия	Гидрофильный	[¹²⁵ I]	[90, 91]
2	<i>n</i> -Диазбензолсульфонат	»	[³⁵ S]	[92-96]
3	N-(4-Азидо-2-нитрофенил)-2-аминоэтилсульфонат	»	[³⁵ S]	[94, 95]
4	3-Азидо-2,7-нафталиндисульфонат	»	Флуоресценция	[97]
5	1-Азидо-5-нафталинсульфонат	Гидрофобный	»	[97]
6	1-Азидо-5-поднафталин	»	[¹²⁵ I]	[98]
7	5-(4-Азидо-2-нитрофенил) тиофенол	»	[³⁵ S]	[98]
8	1-Адамантиндиазиридин	»	[³ H]	[99]
9	1-Миристоил-2,12-амино (4-N-3-нитро-1-азидофенил) лаурил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфо-халин	»	[¹⁴ C]	[94, 95, 100, 101]
10	1-Пальмитоил-2-(2-азидо-4-нитро)бензоил- <i>sn</i> -глицеро-3-фосфохолин	»	[³ H]	[94, 95, 100, 101]
11	1,3-Ди (3- <i>sn</i> -фосфатадил)-2-(N-4-азидо-2-нитрофенил-12-аминододеcanoил)- <i>sn</i> -глицерин	»	Общая радиоактивность	[102]
12	1,3-Ди (3- <i>sn</i> -фосфатадил)-2-(N-4-азидо-2-нитрофенил-β-аланил)- <i>sn</i> -глицерин	»	То же	[102]
13	1-(3- <i>sn</i> -фосфатадил)-3-(1-ацил-2-(N-4-азидо-2-нитрофенил-12-аминододеcanoил) глицеро (3-фосфо)- <i>sn</i> -глицерин	»	»	[102]
14	1-(3- <i>sn</i> -фосфатадил)-3-(1-ацил-2-(N-4-азидо-2-нитрофенил-12-аминододеcanoил) глицеро (3-фосфо)-2-(N-4-азидо-2-нитрофенил-12-аминододеcanoил)- <i>sn</i> -глицерин	»	»	[102]

так как каждая из них представляет группу различных полипептидов. В 1985 г. модель цитохромоксидазы млекопитающих (из печени крысы) была уточнена на основе исследований фермента с помощью расщепляющих реагентов (трипсин, проназа, субтилизин) и антител [103]. Полученные результаты, а также данные по химической сшивке полипептидов фермента [88] и модификации водорастворимым карбодимидом в присутствии цитохрома *c* и без него [104] позволили представить фермент в виде, приведенном на рис. 11.

Поскольку в настоящее время установлена первичная структура всех субъединиц цитохромоксидазы, имеется возможность для более подробного изучения расположения полипептидов в молекуле фермента. Первые результаты в этом направлении были получены в работе [95]. При изучении триптических и бромциановых фрагментов субъединицы IV, меченой гидрофильными и гидрофобными реагентами, было установлено, что N-концевая часть полипептида расположена с матриксной стороны бислоя, участок аминокислотной последовательности 79—98 погружен в мембрану, а C-концевая часть располагается в C-домене фермента.

3.3. Расположение простетических групп

В последнее десятилетие усилия многих исследователей были направлены на решение вопроса о том, в каких субъединицах цитохромоксидазы и как расположены четыре металлоцентра фермента. Первые сообщения о локализации простетических групп отличались крайней противоречи-

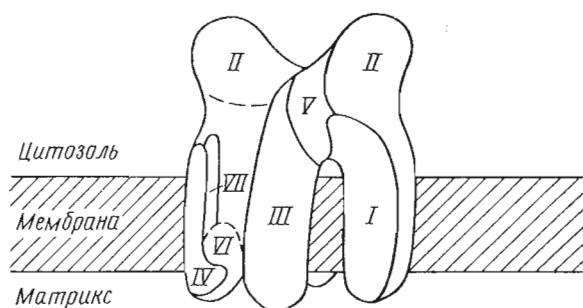


Рис. 10. Схема расположения субъединиц в цитохромоксидазе из сердца быка. Показан димер фермента [2]

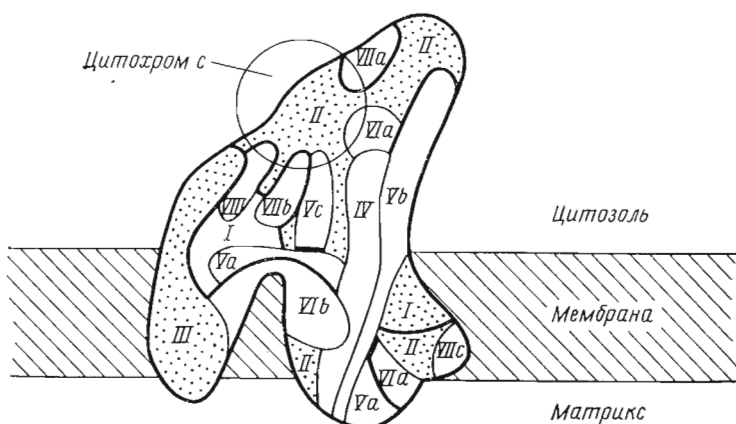


Рис. 11. Модель структурной организации полипептидов в цитохромоксидазе из печени крысы [103]. Точками обозначены субъединицы, синтезируемые в митохондриях

востью. Высказывались предположения о расположении гема *a* в субъединицах I [40], I и III [105], I и V [106], IV и VII [107], VI [108], а меди — в субъединицах II [108], III [109], V и VII [105].

Основная причина несоответствия результатов заключалась в том, что при денатурации фермента, необходимой для разделения полипептидов, происходит освобождение нековалентно связанных металлоцентров, сопровождающееся неспецифическим распределением гема *a* и ионов меди среди различных субъединиц цитохромоксидазы. Для решения этой проблемы были предложены два подхода. Один из них заключался в ковалентной пришивке гемов *a* к ближайшему участку белка. Устойчивая ковалентная связь была создана при восстановлении боргидридом натрия основания Шиффа, образовавшегося при взаимодействии формильной группы порфиринового цикла с аминогруппой белка [110]. После электрофоретического разделения субъединиц ковалентно связанный гем *a* был обнаружен во фракции низкомолекулярных пептидов (для введения радиоактивной метки в гем *a* дрожжевые клетки, из которых была выделена цитохромоксидаза, выращивались в присутствии δ -амино[^{14}C]левулиновой кислоты). Следует отметить, однако, что условия, необходимые для образования основания Шиффа (рН ~ 12 [111]), могли привести к изменению локализации протестических групп.

Другой подход основан на применении особо мягких условий денатурации и разделения полипептидов фермента. С помощью низкотемпературного электрофореза в присутствии додецилсульфата лития и тритона X-100 [112], а также гель-фильтрации [113] было показано, что гем- и медьсодержащими являются субъединицы I и II цитохромоксидазы. В ряде исследований получены косвенные доказательства расположения металлоцентров в этих субъединицах. Так, при восстановлении фермента радиоактивным хромом специфически метилась только субъединица II

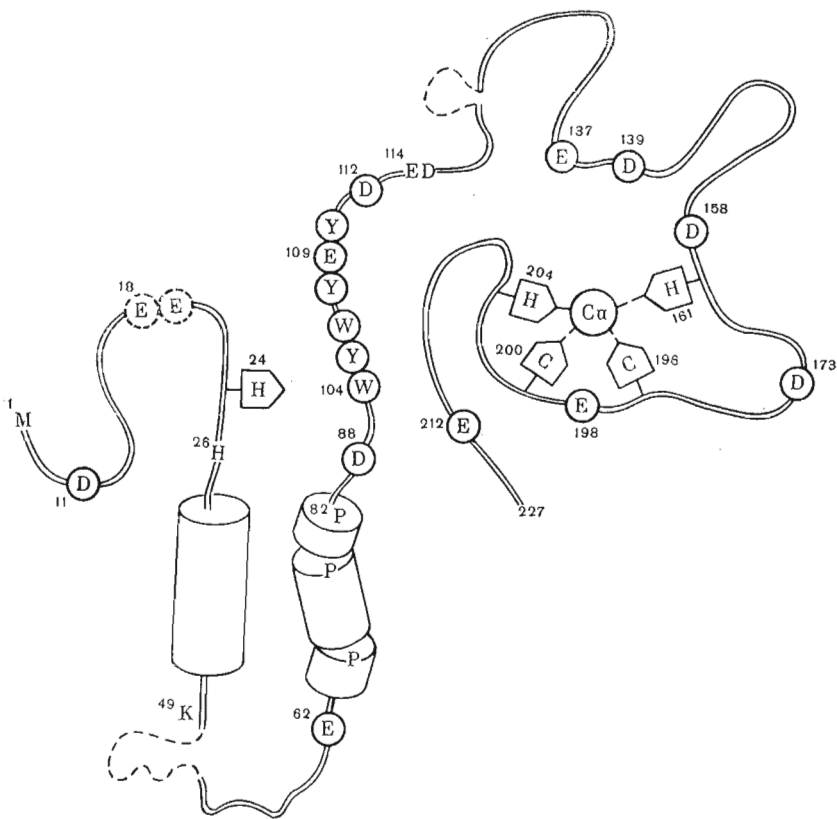


Рис. 12. Схема возможного строения субъединицы II цитохромоксидазы животных [2]. Гидрофобные α -спиральные участки 27—48 и 63—82, расположенные в мембране, представлены в виде цилиндров. Участки 1—26 и 83—227 расположены с цитоплазматической стороны бислоя. Консервативные остатки аминокислот показаны в кружках, цистеин и гистидин — в пятиугольниках. Штриховой линией показаны дополнительные фрагменты фермента дрожжей. Буквами обозначены аминокислотные остатки

[114]. Цитохром *c* взаимодействует также с субъединицей II фермента [2]. При изучении фермента из *P. denitrificans* было обнаружено, что спектральные свойства простетических групп цитохромоксидазы этого микроорганизма, относящегося к прокариотам, и фермента эукариот полностью совпадают [115, 116]. При этом фермент из *P. denitrificans* состоит лишь из двух полипептидов, имеющих гомологию в последовательности с субъединицами I и II цитохромоксидазы из митохондрий [117].

Большую роль в изучении металлоцентров фермента играют спектральные методы: электронный парамагнитный резонанс (ЭПР) [118—120], электронный ядерный двойной резонанс (ENDOR) [121, 122], магнитный круговой дихроизм (MCD) [118, 123], тонкая структура рентгеновских спектров поглощения (EXAFS) [124, 125] и др.

В работе [121] были проанализированы возможные лиганды иона меди Cu_A . Авторы использовали дрожжевую цитохромоксидазу с меченными ^{15}N остатками гистидина и остатками $[\beta, \beta\text{-}^3\text{H}_2]$ цистеина. С помощью методов ЭПР- и ENDOR-спектроскопии обнаружено, что по крайней мере один цистеин и один гистидин являются лигандами этого иона. Между тем известно, что из всех остатков цистеина цитохромоксидазы консервативными являются лишь два остатка в субъединице II (Cys-196 и Cys-200). Кроме того, было найдено, что эти остатки способны реагировать с под-ацетамидом или 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой только после денатурации фермента, т. е. после удаления ионов меди [126]. Третьим лигандом Cu_A , по-видимому, является консервативный гистидин (His-204) [108, 127]. В качестве четвертого лиганда предполагают либо Met-207 [127] (в ферменте из кукурузы он заменен на треонин [128]), либо консер-

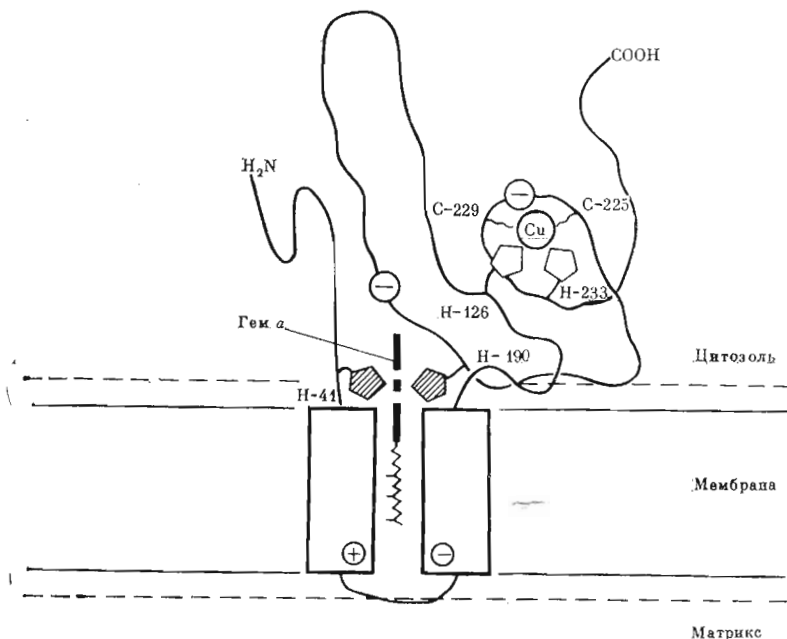


Рис. 13. Схема возможного строения субъединицы II цитохромоксидазы [133]. Прямоугольниками обозначены гидрофобные участки, расположенные в мембране; заштрихованными пятиугольниками — имидазольные кольца гистидинов, взаимодействующих с железом гема *a*, незаштрихованными — с ионом меди. Кругики показывают расположение заряженных аминокислот и знак заряда

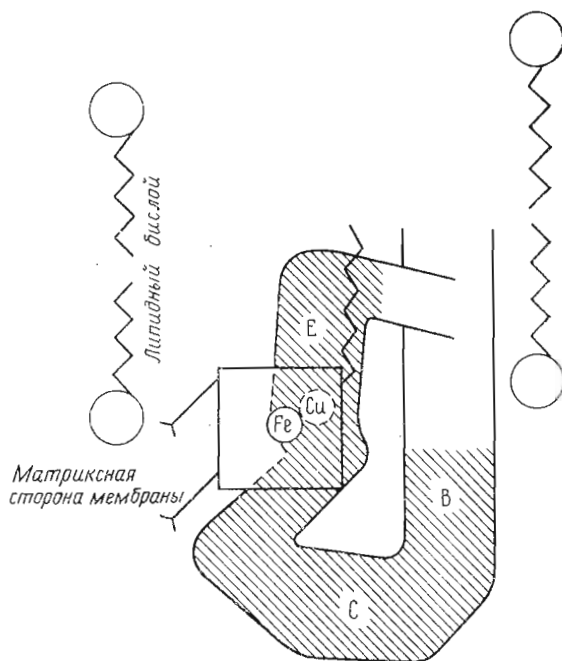


Рис. 14. Модель предполагаемого участка связывания кислорода в субъединице I цитохромоксидазы [136]. Заштрихованная область включает последовательности, гомологичные α -спиральным, B, C и E-участкам глобина. Гем *a* обозначен квадратом с атомом железа в центре. Кислород связывается с гемом *a*₃ с матриксной стороны мембраны

вативный His-161 [129] (рис. 12). Результаты, полученные при изучении синтетических моделей, подкрепляют предположение об участии двух N-доноров в связывании Cu_A [130].

Гем *a* (низкопотенциальный, низкоспиновый), по-видимому, также расположен в субъединице II, поскольку является первым акцептором электронов от цитохрома *c* [131, 132]. Данные, полученные при ENDOR- и MCD-спектроскопии бисимидазольных модельных соединений, указывают на то, что аксильными лигандами железа гема *a* являются два остатка гистидина [122, 123]. На основе анализа аминокислотной последовательности субъединицы II фермента из различных источников была предложена схема участков связывания гема *a* и Cu_A , приведенная на рис. 13 [133]. Для построения модели авторы использовали первичную структуру субъединицы II не из сердечной мышцы быка, а из другого источника. Тем не менее очевидно соответствие остатков гистидина 41, 190 и 233 на рис. 13 гистидинам 24, 161 и 204 на рис. 12. Если принять схему участка связывания Cu_A на рис. 12 как более вероятную, то в качестве лиганда гема *a* остается единственный консервативный остаток гистидина — 24-й. Возможно, что вторым лигандом тогда является остаток гистидина какой-либо другой субъединицы фермента [3]. Кроме того, было установлено, что формильная группа гема *a* образует водородную связь с близлежащим аминокислотным остатком, возможно тирозином, причем сила этой связи зависит от валентного состояния железа гема *a* и различается на 2,0—2,5 ккал/моль у восстановленной и окисленной формы [134].

Гем a_3 и Cu_B (оба высокопотенциальные центры), передающие электроны непосредственно кислороду, вероятно, расположены в одном гидрофобном кармане [134, 135] — предположительно в субъединице I. В работе [136] обнаружено, что наиболее консервативный участок последовательности полипептида I (около His-233) имеет гомологию с последовательностью кислородприсоединяющих участков глобинов. Предложенная авторами модель связывания кислорода в субъединице I цитохромоксидазы представлена на рис. 14.

С помощью спектральных методов, а также рентгеновской дифракции найдены расстояния между металлами, входящими в состав цитохромоксидазы. Cu_A и железо гема *a* (цитохром *a*) удалены друг от друга на 8—13 Å [137], железо гемов *a* и a_3 — на 12—16 Å [138, 139], причем угол между вектором Fe — Fe и нормалью митохондриальной мембраны составляет 30—60°. Наиболее близко расположены железо гема a_3 и Cu_B . Расстояние между ними меняется от 3,75 до 5—5,25 Å в различных состояниях фермента [135, 140—142]. В окисленной форме цитохромоксидазы эти центры предположительно соединены сульфидным [135] или дисульфидным [142] мостиками, которые при восстановлении металлоцентров замещаются молекулярным кислородом [141, 142]. Относительно липидной мембраны гемы *a* и a_3 расположены так, что их плоскости почти перпендикулярны поверхности липидного бислоя ([6], с. 84).

4. ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ЦИТОХРОМА *c* С ЦИТОХРОМОКСИДАЗОЙ

Изучение кинетики взаимодействия цитохрома *c* с цитохромоксидазой привело к выводу о существовании двух участков связывания цитохрома *c* на поверхности фермента [143, 144]. Один из них, низкоаффинный, предположительно включался при наличии кардиолипина, который в связи с этим предполагался необходимым для функционирования фермента [145]. Однако в последнее время появились работы, объясняющие наблюдаемую двухфазную кинетику и с точки зрения существования лишь одного места связывания цитохрома *c* [146—148].

К этому же выводу приводят структурные исследования. В результате ряда работ установлено, что цитохром *c* присоединяется к цитохромоксидазе участком, расположенным непосредственно у гемового кармана и содержащим большое число консервативных остатков лизина [143, 149, 150]. Модификация остатков лизина нейтральными [149, 151] или отри-

цательно заряженными группами [143, 152] приводила к нарушению взаимодействия цитохрома *c* с цитохромоксидазой. В то же время при аналогичной обработке фермент-субстратного комплекса эти остатки лизина (8, 13, 72, 73, 86, 87) не подвергались модификации [153].

Для локализации места присоединения цитохрома *c* к цитохромоксидазе остаток Lys-13 цитохрома *c* модифицировали фотоактивным арил-азидным реагентом [154]. При освещении комплекса цитохром *c* ковалентно связывался в основном с субъединицей II цитохромоксидазы [154, 155]. После фрагментации полипептида II было установлено, что место взаимодействия расположено рядом с остатком His-161 [156]. Описано использование цитохрома *c* дрожжей, модифицированного по остатку Cys-107, расположенному на стороне молекулы, противоположной гемовой щели [157—159]. Активированный 5,5'-дитио-бис(2-нитробензойной) кислотой цитохром *c* образует дисульфидную связь с остатком Cys-115 субъединицы III цитохромоксидазы [160]. Поскольку присоединение тринитробензоата цитохрома *c* приводило к ингибированию электронного транспорта в димере, но не в мономере фермента, было сделано предположение, что цитохром *c* размещается в пространстве глубиной ~20 Å (данные электронной микроскопии [161]) между субъединицей II одного мономера и субъединицей III другого [162].

Наличие ряда положительно заряженных остатков лизина на участке взаимодействия цитохрома *c* с цитохромоксидазой позволило предположить существование в ферменте комплементарных им аминокислотных остатков с отрицательным зарядом. В результате экспериментов с применением водорастворимых карбодимидов было установлено, что этими остатками являются Asp-112, Glu-114 и Glu-198 субъединицы II [129, 163]. Интересно, что участок 104—115 полипептида II содержит большое число консервативных остатков ароматических аминокислот, которые могут служить электропереносящим мостиком между цитохромом *c* и гемом *a* с *Cu*. Обнаружено также, что во взаимодействии с цитохромом *c* участвуют карбоксильные группы не только субъединицы II, но и ряда других, менее крупных полипептидов [164], различающихся в цитохромоксидазе из печени и сердца свиньи [104]. Последние данные подтверждают предположение о существовании тканеспецифичных изоферментов у высших организмов [17].

Применение нового метода изучения поверхности мембранных белков, заключающегося в обработке образцов термически активированными атомами трития, которые замещают протоны в слое до 3 Å, к двумерным кристаллам цитохромоксидазы и ее комплекса с цитохромом *c* показало, что цитохром *c* экранирует от воздействия трития субъединицы I, II, VIc и VII [165].

Цитохромоксидаза представляет собой сложный объект для исследований. Рассмотренный материал отражает современные представления о расположении фермента в мембране, взаимном расположении полипептидов, их строении и способах выделения и идентификации.

Нерешенными остаются вопросы о расположении простетических групп, о роли и функциях малых субъединиц фермента и путях практического использования цитохромоксидазы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биоорг. химия. 1979. Т. 5. № 7. С. 965—968.
2. Capaldi R. A., Malatesta F., Darley-Usmar V. M. // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 726. № 1. P. 135—148.
3. Azzi A. // Experientia. 1984. V. 40. № 9. P. 901—906.
4. Beinert H. // J. Inorg. Biochem. 1985. V. 23. N 3/4. P. 389—393.
5. Ludwig B. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 594. № 2—3. P. 177—189.
6. Wikstrom M., Krab K., Saraste M. Cytochrome oxidase. A synthesis. L.: Acad. Press, 1981. 198 p.
7. Helenius A., Simons K. // Biochim. et biophys. acta. 1975. V. 415. № 1. P. 29—79.
8. Jacobs E. E., Andrews E. C., Cunningham W., Crane F. L. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 25. № 1. P. 87—94.
9. Kuboyama M., Jong F. C., King T. E. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 20. P. 6375—6383.

10. Ionetani T. // J. Biol. Chem. 1961. V. 236. № 6. P. 1680—1688.
11. Fowler L. R., Richardson S. H., Hafeji J. // Biochim. et biophys. acta. 1962. V. 64. № 1. P. 170—173.
12. Yu C. A., Yu L., King T. E. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 4. P. 1383—1392.
13. Jacobs E. E., Kirkpatrick F. M., Andrews E. C. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1966. V. 25. № 1. P. 96—104.
14. Mason T. L., Poyton R. O., Wharton D. C., Schatz G. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 4. P. 1346—1354.
15. Rubin M. S., Tzagoloff A. // J. Biol. Chem. 1973. V. 248. № 12. P. 4269—4274.
16. Poyton R. O., Schatz G. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 2. P. 752—761.
17. Kuhn-Nentwig L., Kadenbach B. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 149. № 1. P. 147—158.
18. Saraste M., Penttila T., Wikstrom M. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 115. № 2. P. 261—268.
19. Penttila T. // Eur. J. Biochem. 1983. V. 133. № 2. P. 355—361.
20. Rosen S. // Biochim. et biophys. acta. 1978. V. 523. № 2. P. 314—320.
21. Nagasawa T., Nagasawa-Fujimori H., Heinrich P. C. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 94. № 1. P. 31—39.
22. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 2. С. 192—195.
23. Tanaka M., Ozawa T. // Biochem. Int. 1982. V. 5. № 1. P. 67—75.
24. Goto J., Amuro N., Shukuya R. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 719. № 1. P. 102—109.
25. Scholes S. W., Roh D. D., Jones D. H. // Biochem. Int. 1984. V. 9. № 4. P. 475—482.
26. Power S. D., Lochrie M. A., Severino K. A., Patterson T. E., Poyton R. O. // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 10. P. 6564—6570.
27. Ozawa T., Okumura M., Yagi K. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 65. № 3. P. 1102—1107.
28. Rascatti R. J., Parsons P. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 5. P. 1586—1593.
29. Azzi A. // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 594. № 4. P. 231—252.
30. Bill K., Broger C., Azzi A. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 679. № 1. P. 28—34.
31. Weiss H., Juchs P. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 88. № 1. P. 17—28.
32. Weiss H., Kolb H. J. // Eur. J. Biochem. 1979. V. 99. № 1. P. 138—149.
33. Thompson D. A., Ferguson-Miller S. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 13. P. 3178—3187.
34. Vanneste W. H., Ysebaert-Vanneste M., Mason H. S. // J. Biol. Chem. 1974. V. 249. № 8. P. 7390—7401.
35. Shapiro A. L., Vinuela E., Maizel I. V. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1967. V. 28. № 5. P. 815—820.
36. Weber K., Osborn M. // J. Biol. Chem. 1969. V. 244. № 16. P. 4406—4412.
37. Capaldi R. A., Hayashi H. // FEBS Lett. 1972. V. 26. № 1. P. 261—263.
38. Briggs M., Kamp P. E., Robinson N. C., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1975. V. 14. № 23. P. 5123—5128.
39. Downer N. W., Robinson N. C., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1976. V. 15. № 13. P. 2930—2936.
40. Yu C. A., Yu L. // Biochim. et biophys. acta. 1977. V. 495. № 2. P. 248—259.
41. Chan S. H., Tracy R. P. // Eur. J. Biochem. 1978. V. 89. № 2. P. 595—605.
42. Hochli L., Hackenbrock C. R. // Biochemistry. 1978. V. 17. № 18. P. 3712—3719.
43. Bucher I. R., Penniall R. // FEBS Lett. 1975. V. 60. № 1. P. 180—184.
44. Hundt E., Kadenbach B. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1977. B. 358. № 10. S. 1309—1314.
45. Poyton R. O., McKemmie E., George-Nascimento C. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 18. P. 6303—6306.
46. Merle P., Kadenbach B. // Eur. J. Biochem. 1980. V. 105. № 3. P. 499—507.
47. Merle P., Jaraus J., Trapp M., Scherka R., Kadenbach B. // Biochim. et biophys. acta. 1981. V. 669. № 2. P. 222—230.
48. Kadenbach B., Jaraus J., Hartmann R., Merle P. // Anal. Biochem. 1983. V. 129. № 2. P. 517—521.
49. Laemmli U. K. // Nature. 1970. V. 227. № 5259. P. 680—685.
50. Kadenbach B., Merle P. // FEBS Lett. 1981. V. 135. № 1. P. 1—11.
51. Capaldi R. A. // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 694. № 3. P. 291—306.
52. Buse G., Steffens G. J. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1978. B. 359. № 8. S. 1005—1009.
53. Sebald W., Machleidt W., Otto J. // Eur. J. Biochem. 1973. V. 38. № 2. P. 311—324.
54. Verheul F. E., Boonman J. C., Draijer J. W., Muijsers A. O., Borden D., Tarr G. E., Margoliash E. // Biochim. et biophys. acta. 1979. V. 548. № 2. P. 397—416.
55. Freedman J. A., Chan S. H. // J. Biol. Chem. 1983. V. 258. № 9. P. 5885—5892.
56. Steffens G., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1976. B. 357. № 2. S. 1125—1137.
57. Verheul F. E., Draijer J. W., Dentener J. K., Muijsers A. O. // Eur. J. Biochem. 1981. V. 119. № 2. P. 401—408.
58. Филатов И. А., Нефедова И. В., Кулиш М. А., Миронов А. Ф. // Биооргани. химия. 1985. Т. 11. № 3. С. 1675—1676.

59. King T. E., Yu L., Yu C. A., Wei Y. H. // Cytochrome oxidase / Eds King T. E., Orii Y., Chance B., Okunuki K. Amsterdam: Elsevier, 1979. P. 53—65.
60. Power S. D., Lochrie M. A., Poyton R. O. // J. Chromatogr. 1983. V. 266. № 2. P. 585—592.
61. Buse G., Steffens G. C., Meinecke L. // Dev. Bioenerg. and Biomembr. 1983. № 6. P. 131—138.
62. Weiss H., Sebald W. // Meth. Enzymol. 1978. V. 53. P. 66—73.
63. Saraste M., Pentilla T., Coggins J. R., Wikstrom M. // FEBS Lett. 1980. V. 114. № 1. P. 35—38.
64. Georgevich G., Darley-Usmar V. M., Malatesta F., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 6. P. 1317—1322.
65. Ludwig B., Downer N. W., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 8. P. 1401—1407.
66. Steffens G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. B. 360. № 4. S. 613—619.
67. Sacher R., Steffens G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. B. 360. № 10. S. 1385—1392.
68. Biewald R., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1982. B. 363. N 10. S. 1141—1153.
69. Meinecke L., Buse G. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. V. 366. № 7. P. 687—694.
70. Erdweg M., Buse G. // Biol. Chem. Hoppe-Seyler. 1985. V. 366. № 3. P. 257—263.
71. Steffens G. C., Steffens G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. B. 360. № 11. S. 1641—1650.
72. Meinecke L., Steffens G. J., Buse G. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1984. B. 365. № 3. S. 313—320.
73. Steffens G. C., Steffens G. J., Buse G., Witte L., Nau H. // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1979. B. 360. № 11. S. 1630—1640.
74. Anderson S., de Bruijn M. H., Coulson A. R., Eperon L. C., Sanger F., Yong L. G. // J. Mol. Biol. 1982. V. 156. № 4. P. 683—717.
75. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu W. T. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 76. № 4. P. 1014—1019.
76. Power S. D., Lochrie M. A., Poyton R. O. // J. Biol. Chem. 1987. V. 259. № 10. P. 6575—6578.
77. Frey T. G., Chan S. H., Schatz G. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 12. P. 4389—4395.
78. Henderson R., Capaldi R. A., Leigh J. S. // J. Mol. Biol. 1977. V. 112. № 4. P. 631—648.
79. Fuller S. D., Capaldi R. A., Henderson R. // J. Mol. Biol. 1979. V. 134. № 2. P. 305—327.
80. Fuller S. D., Capaldi R. A., Henderson R. // Biochemistry. 1982. V. 21. № 10. P. 2525—2529.
81. Deatherage J. F., Henderson R., Capaldi R. A. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 3. P. 487—499.
82. Deatherage J. F., Henderson R., Capaldi R. A. // J. Mol. Biol. 1982. V. 158. № 3. P. 500—514.
83. Kim C. H., Radermacher M., Kessel M., Frank J., King T. E. // J. Inorg. Biochem. 1985. V. 23. N 3/4. P. 163—169.
84. Frey T. G., Costello M. J., Chan S. H. // Ultramicroscopy. 1984. V. 13. № 1/2. P. 85—91.
85. Frey T. G., Kuhn L. A., Leigh J. S., Costello M. J., Chan S. H. // J. Inorg. Biochem. 1985. V. 23. № 3/4. P. 155—162.
86. Briggs M. M., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1977. V. 16. № 1. P. 73—77.
87. Briggs M. M., Capaldi R. A. // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1978. V. 80. № 3. P. 553—559.
88. Jarasch J., Kadenbach B. // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. № 1. P. 211—217.
89. Kornblatt J. A., Lake D. F. // Can. J. Biochem. 1980. V. 58. № 3. P. 219—224.
90. Eytan G. D., Schatz G. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 2. P. 767—774.
91. Moreland R. B. // Dissertation Abstr. Int. B. 1983. V. 44. № 2. P. 480.
92. Eytan G. D., Carroll R. C., Schatz G., Racker E. // J. Biol. Chem. 1975. V. 250. № 22. P. 8598—8603.
93. Ludwig B., Downer N. W., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1979. V. 18. № 8. P. 1401—1407.
94. Prochaska L., Bisson R., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1980. V. 19. № 14. P. 3174—3179.
95. Malatesta F., Darley-Usmar V., de Jong C., Prochaska L. J., Capaldi R. A., Steffens G. C. M., Buse G. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 19. P. 4405—4411.
96. Zhang Y. Z., Georgevich G., Capaldi R. A. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 23. P. 5616—5621.
97. Dokter M. E., Koseki T. // Biochemistry. 1983. V. 22. № 16. P. 3954—3961.
98. Cerletti N., Schatz G. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 16. P. 7746—7751.
99. Georgevich G., Capaldi R. A. // Biophys. J. 1982. V. 37. № 1. P. 66—67.
100. Bisson R., Montecucco C., Gulweniger H., Azzi A. // J. Biol. Chem. 1979. V. 254. № 20. P. 9962—9955.
101. Bisson R., Steffens G. C., Buse G. // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 12. P. 6716—6720.
102. Fowler W. T. // Dissertation Abstr. Int. B. 1984. V. 44. № 7. P. 2140.

103. *Jarausch J., Kadenbach B.* // Eur. J. Biochem. 1985. V. 146. № 1. P. 219—225.
104. *Kadenbach B., Stroh A.* // FEBS Lett. 1984. V. 17^o. № 2. P. 374—380.
105. *Guttrige S., Winter D. B., Bruyninckx W. J., Mason H. S.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 78. № 3. P. 945—951.
106. *Yu C. A., Yu L., King T. E.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1977. V. 74. № 2. P. 670—676.
107. *Werner S.* // Eur. J. Biochem. 1977. V. 79. № 1. P. 109—110.
108. *Buse G., Steffens G. J., Steffens G. C.* // Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 1978. B. 358. № 8. S. 1011—1013.
109. *Tanaka M., Hanin M., Zeitlin S., Yasunobu K. T.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1975. V. 66. № 1. P. 357—367.
110. *Schatz G., Groot G. S., Mason T., Rouslin W., Wharton D. C., Saltzgaber J.* // Fed. Proc. 1972. V. 31. № 1. P. 21—29.
111. *Takemori S., King T. E.* // J. Biol. Chem. 1965. V. 240. № 1. P. 504—513.
112. *Winter D. B., Bruyninckx W. K., Foulke F. G., Grinich N. P., Masson H. S.* // J. Biol. Chem. 1980. V. 255. № 23. P. 11408—11414.
113. *Corbley M. J., Azzi A.* // Eur. J. Biochem. 1984. V. 139. № 3. P. 535—540.
114. *Jones G. D., Wilson M. T.* // J. Inorg. Biochem. 1984. V. 21. № 2. P. 158—168.
115. *Ludwig B., Schatz G.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1980. V. 77. № 1. P. 186—200.
116. *Ludwig B.* // Biochim. et biophys. acta. 1980. V. 594. № 2/3. P. 177—189.
117. *Steffens G. C., Buse G., Oppliger W., Ludwig B.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1983. V. 116. № 1. P. 335—340.
118. *Weintraub S. T., Muhoberac B. B., Wharton D. C.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 9. P. 4940—4946.
119. *Hagen W. R., Dunham W. R., Sands R. H., Shaw R. W., Beinert H.* // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 765. № 3. P. 398—402.
120. *Goodman G.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 24. P. 15094—15099.
121. *Stevens T. H., Martin C. T., Wang H., Brudwig G. W., Scholes C. P., Chan S. I.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 20. P. 12106—12113.
122. *Martin C. T., Scholes C. P., Chan S. I.* // J. Biol. Chem. 1985. V. 260. № 5. P. 2857—2861.
123. *Eglinton D. G., Hill B. C., Greenwood C., Thompson A. J.* // J. Inorg. Biochem. 1984. V. 21. № 1. P. 1—8.
124. *Scott R. A.* // NATO Adv. Study Inst. Ser. Ser. C. 1982. V. 89. P. 459—474.
125. *Naqui A., Kumar C., Ching Y. C., Powers L., Chance B.* // Biochemistry. 1984. V. 23. № 25. P. 6222—6227.
126. *Darley-Usmar V. M., Capaldi R. A., Wilson M. T.* // Biochem. and Biophys. Res. Commun. 1981. V. 103. № 4. P. 1223—1230.
127. *Lindean M. A.* // J. Inorg. Biochem. 1983. V. 18. № 1. P. 1—9.
128. *Fox T. D., Leaver C. I.* // Cell. 1981. V. 26. № 3. P. 315—323.
129. *Millett F., Darley-Usmar V., Capaldi R. A.* // Biochemistry. 1982. V. 21. № 16. P. 3857—3862.
130. *Toftlund H., Bechler J., Olesen P. II., Pedersen J.* // Isr. J. Chem. 1985. V. 25. № 1. P. 56—65.
131. *Nichollson P., Chanady G. A.* // Biochem. J. 1982. V. 203. № 3. P. 541—549.
132. *Jones G. D., Jones M. G., Wilson M. T., Brunori M., Colosimo A.* // Biochem. J. 1983. V. 209. № 1. P. 175—182.
133. *Saraste M., Wikstrom M.* // Dev. Bioenerg. and Biomembr. 1983. № 6. P. 139—144.
134. *Callahan P. M., Babcock G. T.* // Biochemistry. 1983. V. 22. № 2. P. 452—461.
135. *Powers L., Chance B., Ching Y., Angiolillo P.* // Biophys. J. 1981. V. 34. № 3. P. 465—496.
136. *Welinder K. G., Mikkelsen L.* // FEBS Lett. 1983. V. 157. № 2. P. 233—239.
137. *Goodman G., Leigh J. S.* // Biochemistry. 1985. V. 24. № 9. P. 2310—2317.
138. *Ohnishi T., LoBrutto R., Salerno J. C., Bruckner R. C., Prey T. G.* // J. Biol. Chem. 1982. V. 257. № 24. P. 14824—14825.
139. *Blasie J. K., Pachence J. M., Travormina A., Erecinska M., Dutton P. L., Stamatof J., Eisenberg P., Brown G.* // Biochim. et biophys. acta. 1982. V. 679. № 2. P. 188—197.
140. *Boelens R., Wever R., Van Gelder B. F., Rademaker H.* // Biochim. et biophys. acta. 1983. V. 724. № 2. P. 176—183.
141. *Boelens R., Rademaker H., Wever R., Van Gelder B. F.* // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 765. № 2. P. 196—209.
142. *Thomson A. J., Greenwood C., Gadsby P. M., Peterson J., Eglinton D. G., Hill B. C., Nicholls P.* // J. Inorg. Biochem. 1985. V. 23. № 3/4. P. 187—197.
143. *Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E.* // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 1. P. 149—159.
144. *Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E.* // J. Biol. Chem. 1976. V. 251. № 4. P. 1104—1115.
145. *Vik S. B., Georgevich G., Capaldi R. A.* // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 1981. V. 78. № 3. P. 1456—1460.
146. *Sinjorgo K. M., Meijling J. H., Muijsers A. O.* // Biochim. et biophys. acta. 1984. V. 767. № 1. P. 48—56.
147. *Michel B., Bosshard H. R.* // J. Biol. Chem. 1984. V. 259. № 16. P. 10085—10091.
148. *Malmstroem B. G., Andreasson L. E.* // Inorg. J. Biochem. 1985. V. 23. № 3/4. P. 233—242.

149. Smith H. T., Standenmayer N., Millet F. // *Biochemistry*. 1977. V. 16. № 23. P. 4971—4974.
150. Rieder R., Bosshard H. R. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. № 17. P. 6045—6053.
151. Smith H. T., Ahmed A. J., Millet F. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 10. P. 4984—4990.
152. Speck S. H., Ferguson-Miller S., Osheroff N., Margoliash E. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1979. V. 76. № 1. P. 155—159.
153. Reider R., Bosshard H. R. // *J. Biol. Chem.* 1980. V. 255. № 10. P. 4732—4739.
154. Bisson R., Azzi A., Gutweniger H., Colonna R., Montecucco C., Zanotti A. // *J. Biol. Chem.* 1978. V. 253. № 6. P. 1874—1880.
155. Bisson R., Jacobs B., Capaldi R. A. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. № 18. P. 4173—4178.
156. Bisson R., Steffens G. C., Capaldi R. A., Buse G. // *FEBS Lett.* 1983. V. 144. № 2. P. 359—363.
157. Birchmeier W., Kohler C. E., Schatz G. // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 1976. V. 73. № 12. P. 4334—4338.
158. Moreland R. N., Docktor E. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1981. V. 99. № 1. P. 339—346.
159. Fuller S. D., Darley-Usmar V. M., Capaldi R. A. // *Biochemistry*. 1981. V. 20. № 24. P. 7046—7053.
160. Malatesta F., Capaldi R. A. // *Biochem. and Biophys. Res. Commun.* 1982. V. 109. № 4. P. 1180—1185.
161. Fuller S. D. // *Dissertation Abstr. Int. B.* 1981. V. 42. № 5. P. 1855.
162. Darley-Usmar V. M., Georgevich G., Capaldi R. A. // *FEBS Lett.* 1984. V. 166. № 1. P. 131—135.
163. Millet F., Yong G., Paulson L., Capaldi R. A. // *Biochemistry*. 1983. V. 22. № 3. P. 546—552.
164. Bisson R., Montecucco C. // *FEBS Lett.* 1982. V. 150. № 1. P. 46—51.
165. Филатов И. А., Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Пожевникова Е. В., Нейман Л. А. // *Биоорг. химия*. 1987. Т. 13. № 5. P. 623—627.

Поступила в редакцию
20.III.1987

CYTOCHROME OXIDASE: STRUCTURE AND PROPERTIES

FILATOV I. A., KULISH M. A., MIRONOV A. F.

M. V. Lomonosov Institute of Fine Chemical Technology, Moscow

Recent data on the isolation and purification methods of cytochrome oxidase and its subunits are reviewed. Data are discussed on the enzyme's arrangement in the membrane, on the subunit composition and topology, localization of prosthetic groups, interaction of cytochrome oxidase with cytochrome *c*.