



УДК 577.152.191.3'104

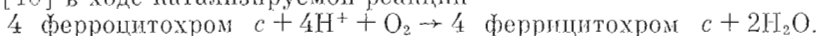
РЕАКЦИЯ ОКИСЛЕННОЙ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ С ЦИАНИДОМ.
ЭФФЕКТЫ pH, ЦИТОХРОМА *c* И МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ

Андреев И. М., Константинов А. А.

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,
Межфакультетская лаборатория молекулярной биологии
и биоорганической химии им. А. Н. Белозерского*

Исследовано связывание HCN с окисленной цитохромоксидазой сердца быка в субмитохондриальных частицах, с очищенной цитохромоксидазой в присутствии детергента и с ферментом, встроенным в липосомы. Во всех случаях реакция протекает с образованием интермедиата и ее кинетика может быть описана в соответствии с михаэлисовским уравнением формальными параметрами K_m и k_{max} . K_m реакции сильно зависит от окружения фермента, возрастая в 100–1000 раз при солиобилизации и снижаясь при встраивании фермента в липосомы либо при добавлении к нему цитохрома *c*. pH-зависимость скорости реакции показывает, что в субмитохондриальных частицах и протеолипосомах, а также в случае очищенного фермента в присутствии цитохрома *c* HCN избирательно связывается с формой цитохромоксидазы, в которой гемсопряженная группа с рК 6,5–6,9 находится в протонированном состоянии.

Исследования связывания лигандов с гемопротейдами показали, что кинетика и термодинамика этих реакций, как правило, зависят от кислотно-основного равновесия так называемых гемсопряженных ионизируемых групп [1–6]. Протонирование-депротонирование гемсопряженных групп представляет интерес при изучении гемопротейдов дыхательной цепи, функционирующих как редокс-зависимые протонные насосы [7–10]. Как показали исследования последних лет, в дыхательной цепи митохондрий к таким гемопротейдам относится цитохромоксидаза (КФ 1.9.3.1), осуществляющая электрогенный перенос протонов через сопрягающую мембрану [10] в ходе катализируемой реакции



Хотя природа кислотно-основных групп цитохромоксидазы, участвующих в транслокации ионов H^+ , не установлена, предполагается, что ведущую роль в этом процессе играют гемсопряженные ионизируемые аминокислотные остатки белка [10].

Цитохромоксидаза в окисленной форме прочно связывает одну молекулу цианида на молекулу фермента, содержащую один гем *a* и один гем *a*₃. Эта реакция сопровождается переходом высокоспинового гема *a*₃ в низкоспиновый феррицианокомплекс $a_3^{3+} \cdot HCN$ [11–14]. Взаимодействие окисленной цитохромоксидазы с цианидом в митохондриях сердца голубя [15] и печени крысы [16] контролируется протонированием группы фермента с рК_a ~ 7,0, находящейся в окружении гема *a*₃. Было высказано предположение, что эта группа участвует в электрогенном захвате протонов цитохромоксидазой из матрикса митохондрий [17].

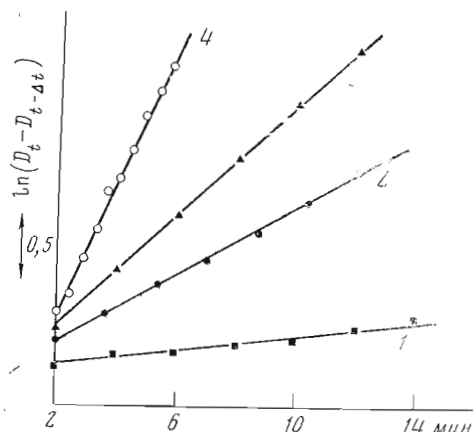
Возможность использования реакции цитохромоксидазы с цианидом в качестве индикатора протонирования окружения гема *a*₃ ограничивается относительной сложностью кинетики связывания этого лиганда. В то время как взаимодействие цианида с большинством окисленных высокоспиновых гемопротейдов, в том числе и с так называемой оксигенированной конформацией окисленной цитохромоксидазы [18], — быстрая бимолекулярная реакция, в случае окисленной «покоящейся» цитохромоксидазы

Сокращения: MES — N-морфолиноэтансульфокислота, MOPS — N-морфолинопропансульфокислота, HEPES — N-2-гидроксиэтилпиперазин-N'-2-этансульфокислота.

рассматриваемая реакция идет необычно медленно и включает по меньшей мере две стадии [12, 13, 15, 16]. При насыщающих концентрациях цианида скорость образования конечного комплекса $a_3^{3+} \cdot \text{HCN}$ лимитируется медленным конформационным изменением фермента [12]. Другое интригующее обстоятельство заключается в том, что в случае очищенной цитохром-оксидазы взаимодействие с цианидом при ненасыщающих концентрациях последнего замедляется примерно в 1000 раз по сравнению с митохондриальным цитохромом a_3^{3+} [12, 13, 19, 20].

В настоящей работе подробно изучена кинетика взаимодействия цианида с окисленной цитохромоксидазой из сердца быка в растворимой и мембранной формах.

Рис. 1. Кинетика образования комплекса цианида с мембранной и растворимой окисленной цитохромоксидазой. Кинетические кривые обработаны по методу Гуггенгейма. 1 — субмитохондриальные частицы в присутствии 1,7 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона, 2 мкМ NaCN, pH 7,5; 2 — цитохромоксидазные протеолипосомы, 600 мкМ NaCN, pH 7,2; 3 — очищенная цитохромоксидаза, 4,8 мМ NaCN, pH 6,2; 4 — очищенная цитохромоксидаза в присутствии 15 мкМ феррицитохрома с, 100 мкМ NaCN, pH 7,0. Концентрация белка в препаратах составляла: 1 — 1–2; 2 — 0,13, 3 — 0,12 и 4 — 0,16 мг/мл



Реакция цианида с окисленной цитохромоксидазой в субмитохондриальных частицах. Связывание цианида с окисленной цитохромоксидазой в субмитохондриальных частицах сердца быка имеет в основном такой же характер, что и в случае митохондрий сердца голубя [15] и печени крысы [16]. Образование спектрально различного комплекса цианида с цитохромом a_3^{3+} при избытке лиганда над ферментом следует кинетике первого порядка (рис. 1).

Зависимость скорости реакции от концентрации цианида характеризуется насыщением, что свидетельствует об образовании промежуточного продукта. Соответственно зависимости эффективной константы скорости реакции от концентрации цианида, построенные в координатах Лайнуивера — Берка, носят линейный характер (рис. 2), т. е. согласуются с кинетикой, описываемой уравнением Михаэлиса — Ментен. Эти зависимости были использованы для нахождения формальных кинетических констант K_m и $V(k_{\max})$.

Реакция цианида с окисленной цитохромоксидазой в субмитохондриальных частицах сильно замедляется при значениях pH выше 7, что обусловлено в основном ростом величины K_m (рис. 2). Величина k_{\max} в исследованной области pH изменялась в различных сериях опытов в 2–4 раза (табл. 1). Зависимость K_m от pH для цитохромоксидазы (субмитохондриальных частиц) (рис. 3. 1) близка к тем, что были получены ранее для митохондрий сердца голубя [15] и печени крысы [16] (см. табл. 2), и удовлетворительно соответствует избирательному связыванию цианида с формой окисленной цитохромоксидазы, в которой группа ϵ $pK_a \sim 6,6$ протонирована, с ее зависящей от pH величиной $K_m' 3,5$ мкМ.

Реакция цианида с окисленной формой очищенной цитохромоксидазы. В условиях наших экспериментов было найдено в соответствии с данными работы [12], что в первые 10–15 мин ход реакции очищенного фермента с цианидом не отклоняется сколько-нибудь заметно от монофазной кинетики первого порядка (рис. 1), за возможным исключением самых начальных стадий реакции ($t < 1$ мин) при низких концентрациях цианида (данные не приведены).

Выяснилось, что выделение цитохромоксидазы из сопрягающей мембраны приводит к двум основным эффектам, касающимся взаимодействия окисленного фермента с цианидом. Во-первых, реакция сильно замедляется (константа скорости второго порядка падает примерно в 1000 раз) из-за смещения величины K_m от 10^{-6} — 10^{-3} М, характерных для мембранного фермента в митохондриях и субмитохондриальных частицах, в область 10^{-3} — 10^{-2} М (рис. 3, 2) без существенного изменения величины k_{max} (табл. 1). Этот результат согласуется с данными, полученными ранее другими авторами [12, 13, 19]. Во-вторых, исчезает характерная зависимость скорости этой реакции от рН (рис. 3, 2), хотя некоторое увеличение K_m с ростом рН все же наблюдается.

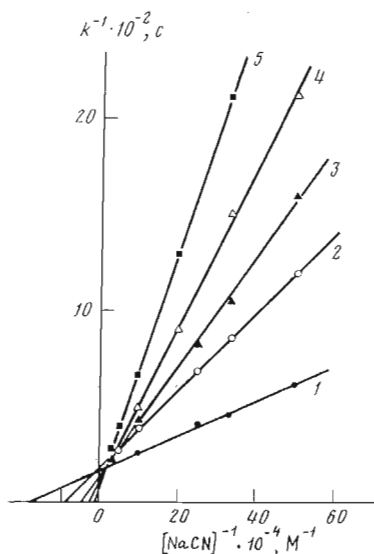


Рис. 2

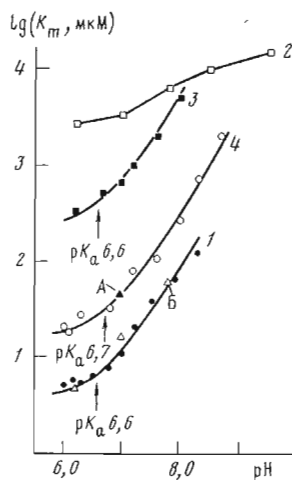


Рис. 3

Рис. 2. Зависимость скорости связывания цианида с феррицитохромом a_3 субмитохондриальных частиц от концентрации ингибитора при рН 6 (1), 7 (2), 7,2 (3), 7,5 (4) и 8,3 (5). Буферные среды (см. «Экспер. часть») дополнены 1,7 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном. Концентрация белка 1—2 мг/мл

Рис. 3. Зависимость K_m реакции феррицитохрома a_3 с цианидом от рН в субмитохондриальных частицах (1), очищенном ферменте (2), реконструированных цитохромоксидазных протеолипосомах (3) и очищенном ферменте в присутствии 15 мкМ цитохрома *c* (4). Концентрацию белка см. рис. 1. Буферные среды (указаны в «Экспер. части») дополнены в случае (1) 1,7 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразоном, а в случае (4) — 170 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$. А — точка, соответствующая данным, полученным в присутствии 40 мкМ цитохрома *c*, когда за реакцией следили по разности поглощения при 587 и 645 нм (из-за слишком большого поглощения реакционной смеси в полосе Сорэ). В — цитохромоксидазные протеолипосомы в присутствии 2 мкМ цитохрома *c* и 200 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$; значения K_m соответствуют быстрой фазе реакции, стимулированной цитохромом *c*. Теоретические кривые в случаях (1), (3) и (4) соответствуют параметрам, указанным в табл. 2

Реакция цианида с окисленной цитохромоксидазой, встроенной в фосфолипидные липосомы. При встраивании очищенной цитохромоксидазы в липосомы каталитические и спектральные свойства этого фермента максимально приближаются к характеристикам цитохромоксидазы в интактной сопрягающей мембране [21, 22]. Поэтому представляло интерес выяснить, восстанавливается ли исходная кинетика реакции с цианидом, наблюдаемая в митохондриях и субмитохондриальных частицах, при встраивании очищенного фермента в фосфолипидные пузырьки. Мы обнаружили, что в липосомах реакция цианида с окисленной цитохромоксидазой проявляет зависимость величины K_m от рН, которая близка к той, что была найдена в субмитохондриальных частицах (ср. кривые 1 и 3, рис. 3). Вместе с тем абсолютные значения K_m остаются в области, характерной для очищенного фермента, по крайней мере при щелочных значениях рН.

pH-зависимость реакции очищенной цитохромоксидазы с цианидом в присутствии цитохрома *c*. В работе [23] нами было обнаружено, что реакция окисленной формы очищенной цитохромоксидазы с цианидом значительно ускоряется феррицитохромом *c*, а также другими основными белками, такими, как протамин. Этот эффект цитохрома *c* в основном обусловлен сильным снижением K_m рассматриваемой реакции [23]. Наши дальнейшие исследования показали, что в присутствии феррицитохрома *c* кинетика реакции очищенной цитохромоксидазы с цианидом становится существенно зависимой от концентрации ионов H^+ .

pH-зависимость величины K_m , характеризующая взаимодействие цианида с очищенным цитохромом $a^{3+} a_3^{3+}$ при относительно низкой ионной силе в присутствии близкой к насыщающей [23] концентрации цитохрома *c*

Таблица 1

Зависимость максимальной скорости связывания цианида с окисленной цитохромоксидазой от *pH*

Препарат	<i>pH</i>	$k_{\text{макс}}$, c^{-1}
Субмитохондриальные частицы	6,0	0,006
	8,0	0,013
Очищенный фермент	6,2	0,006
	7,8	0,025
Цитохромоксидазные протеолипосомы	6,2	0,004
	8,0	0,016

Таблица 2

Параметры, характеризующие K_m реакции цианида с окисленной цитохромоксидазой как функцию от *pH*:

$$K_m(pH) = K'_m (10^{pH - pK_a} + 1)$$

Препарат	K'_m , мкМ	pK_a
Субмитохондриальные частицы	3,5	6,6
Очищенный фермент + 15 мкМ цитохром <i>c</i>	16	6,7
Цитохромоксидазные протеолипосомы	215	6,6
Митохондрии сердца голубя [15] *	4	6,9
Митохондрии печени крысы [16] *	2,6	6,5

* Данные работ [15, 16] приведены для сравнения.

(15 мкМ), показана на рис. 3 (кривая 4). Можно видеть, что цитохром *c* не только сильно снижает величину K_m (примерно в 100 раз), но и восстанавливает исходную *pH*-зависимость кинетики этой реакции, характерную для мембранного фермента.

Таким образом, можно предположить, что основным фактором, ответственным за эффект мембранного окружения на реакцию окисленной цитохромоксидазы с цианидом, является взаимодействие фермента с цитохромом *c*.

Вместе с тем значения K_m реакции очищенного фермента с цианидом при данной концентрации цитохрома *c* все же несколько выше тех, что были найдены для митохондрий и субмитохондриальных частиц (табл. 2). Полное восстановление характерной для митохондрий и субмитохондриальных частиц кинетики связывания цианида с гемом a_3^{3+} может быть достигнуто при добавлении цитохрома *c* к фосфолипидным липосомам, содержащим окисленную цитохромоксидазу.

Влияние цитохрома c на реакцию окисленной цитохромоксидазы с цианидом в липосомах. Связывание цианида с окисленной цитохромокси-

дазой, встроенной в мембрану азолектиновых липосом, показано на рис. 4. Видно, что в присутствии цитохрома *c* процесс сильно ускоряется (кривые 1 и 2, рис. 4), подобно тому как это наблюдалось для очищенного фермента [23]. В случае цитохромоксидазы, встроенной в липосомы, ускорение реакции фермента с цианидом достигает насыщения при концентрации цитохрома *c* 1–2 мкМ (рис. 5, 3). Выяснилось, однако, что кинетика образования комплекса цианида с цитохромом a_3^{3+} в липосомах носит явно выраженный двухфазный характер (рис. 6). Анализ данных, полученных в широком диапазоне концентраций цианида, показывает, что такая кинетика отражает два независимых процесса с различными значениями K_m и не слишком различающимися значениями $k_{\text{макс}}$. Низкая величина K_m ,

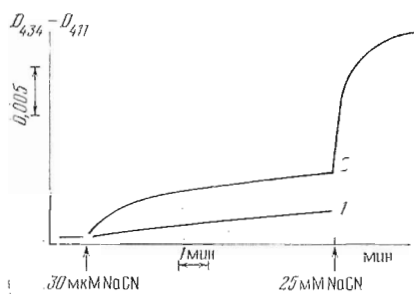


Рис. 4

Рис. 4. Действие цитохрома *c* на связывание цианида с цитохромоксидазой, встроенной в фосфолипидные липосомы. Протеолипосомы (0,12 мг белка/мл) в среде инкубации, содержащей 0,2 М сахарозу, 50 мМ НЕРЕС, 140 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$, pH 7,2; без цитохрома *c* (1) и в присутствии 2 мкМ цитохрома *c* (2)

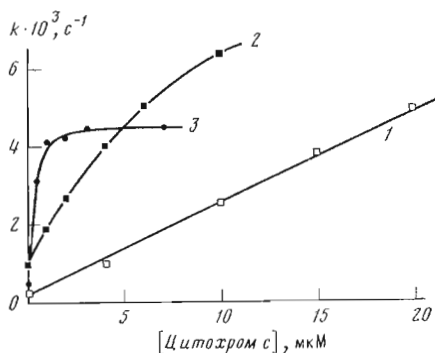


Рис. 5

Рис. 5. Зависимость стимуляции реакции цитохрома a_3^{3+} с цианидом от концентрации добавленного феррицитохрома *c*. 1 – цитохромоксидаза (0,16 мг белка/мл) в среде инкубации: 50 мМ KH_2PO_4 , 0,5% твин 80, 170 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$, pH 7,5, концентрация NaCN 300 мкМ; 2 – то же, что и в 1, но вместо фосфатного буфера в среде инкубации 50 мМ НЕРЕС; 3 – протеолипосомы (0,12 мг белка/мл) в среде инкубации: 0,2 М сахароза, 50 мМ НЕРЕС, 170 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$, pH 7,7; концентрация NaCN 30 мкМ

соответствующая фаза, появляющейся при добавлении цитохрома *c*, приближается к величине, характеризующей реакцию цитохрома a_3^{3+} с цианидом в субмитохондриальных частицах. Высокое значение K_m второй фазы типично для цитохромоксидазных липосом в отсутствие цитохрома *c* (ср. рис. 3).

Эти результаты находят объяснение, если предположить, что в липосомах лишь часть молекул цитохромоксидазы доступна добавленному снаружи цитохрому *c*. Следует заметить, что проблема ориентации цитохромоксидазы в мембране протеолипосом далека от ясности. В свое время Рэкер и сотр. [24, 25] установили, что аэробное окисление ферроцитохрома *c* цитохромоксидазой, встроенной в липосомы, не стимулируется детергентами. Отсюда был сделан вывод, что все молекулы цитохромоксидазы в липосомах ориентированы одинаково, так что участок связывания цитохрома *c* находится, как в митохондриях, на внешней поверхности мембраны. Эта точка зрения разделяется и другими авторами [26, 27].

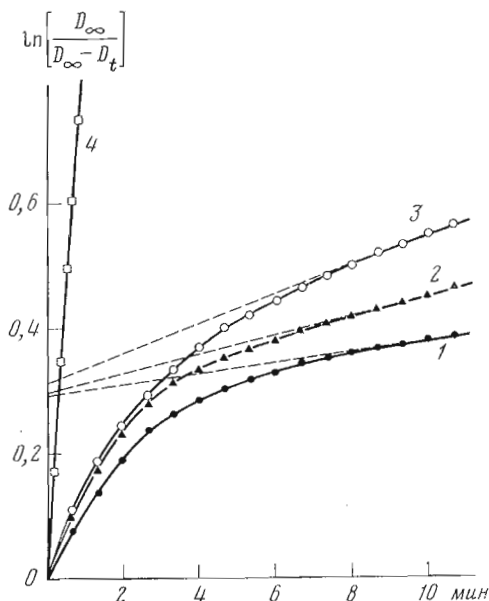
С другой стороны, Риггелсуорт и Николс показали [28], что в липосомах примерно половина молекул цитохромоксидазы восстанавливается в анаэробных условиях аскорбатом в присутствии добавленного снаружи цитохрома *c*, и продемонстрировали, что каталитическая активность остальных молекул цитохромоксидазы, недоступных для не проникающих через мембрану восстановителей, не выявляется агентами, разрушающими мембрану.

Данные, полученные в настоящей работе, хорошо согласуются с результатами группы Николса. Хотя в цитохромоксидазных липосомах, окисляю-

щих аскорбат в присутствии цитохрома *c* в среде с разбавителем и валиномицином, добавление 0,1–1,5% твина 80 не стимулировало дыхание, лишь 30–60% молекул цитохромоксидазы (в зависимости от препарата липосом) анаэробно восстанавливались аскорбатом в отсутствие проникающих редокс-медиаторов (данные не приведены). Было найдено, что если проводить опыты с препаратом липосом в тот же день, то примерно одна и та же доля молекул цитохромоксидазы стимулируется феррицитохромом *c* в случае реакции окисленного фермента с цианидом и восстанавливается внешним ферроцитохромом *c* в анаэробнозе.

Было интересно выяснить, могут ли недоступные снаружи молекулы цитохромоксидазы стимулироваться цитохромом *c* изнутри фосфолипид-

Рис. 6. Кинетика связывания цианида с цитохромоксидазой, встроенной в липосомы, в присутствии внешнего цитохрома *c*. Протеолипосомы (0,12 мг белка/мл) в среде инкубации, содержащей 0,3 М сахарозу, 30 мМ MOPS (рН 7,0), 200 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$ и 2 мкМ цитохромом *c*; концентрации NaCN соответственно: 1–20, 2–30, 3–50 мкМ, 4–7 мМ



ных пузырьков. С этой целью мы приготовили липосомы, нагруженные цитохромом *c* (10 мкМ); внешний цитохром *c* был удален путем двукратного пропуска липосом через колонку с сефадексом G-25, уравновешенную с 0,1 М KH_2PO_4 , рН 7,5. Присутствие цитохрома *c* внутри липосом, освобожденных от внешнего цитохрома *c*, было проверено путем записи дифференциального спектра поглощения. Оказалось, что находящийся внутри липосом цитохром *c* не влияет на кинетику связывания цианида с цитохромоксидазой (рис. 7, 1 и 2), в то время как цитохром *c*, добавленный снаружи, по-прежнему стимулирует эту реакцию (рис. 7, 3).

Таким образом, отсутствие взаимодействия части молекул цитохромоксидазы с внешним цитохромом *c* нельзя объяснить их обратной ориентацией, при которой цитохром-*c*-связывающий участок обращен во внутреннюю водную фазу липосом. Следует предположить, что либо доля молекул цитохромоксидазы в протеолипосомах недоступна для цитохрома *c* ни с одной из сторон мембраны (речь идет о доступности участка связывания цитохрома *c*), либо эта фракция фермента характеризуется изменением структуры и химических свойств и не отвечает на взаимодействие с цитохромом *c*.

Роль мембранного окружения в реакции цитохромоксидазы с цианидом. Сильное различие в реакционной способности митохондриальной и очищенной цитохромоксидазы по отношению к цианиду долгое время считалось наиболее ярким примером действия мембранного окружения на свойства фермента. Причину эффектов мембранного окружения можно было бы искать во взаимодействии фермента с фосфолипидным бислоем, а также с белками, контактирующими с цитохромоксидазой в мембране. Как показано в этой работе, включение очищенной цитохромоксидазы в мембрану искусственных фосфолипидных пузырьков не восстанавливает

исходную кинетику связывания цианида, наблюдаемую в митохондриях и субмитохондриальных частицах, хотя и происходит определенный сдвиг в сторону более «нативных» характеристик процесса (восстановление pH-зависимости реакции, некоторое снижение величины K_m). Таким образом, взаимодействия фермента с фосфолипидным бислоем недостаточно для имитации нативного окружения и основную роль играет, по-видимому, эффект цитохрома *c*.

Известно, что взаимодействие цитохрома *c* с цитохромоксидазой не ограничивается функционированием первого, как естественного донора электронов. Так, показано, что цитохром *c* облегчает перераспределение электронов между редокс-центрами частично восстановленной очищенной

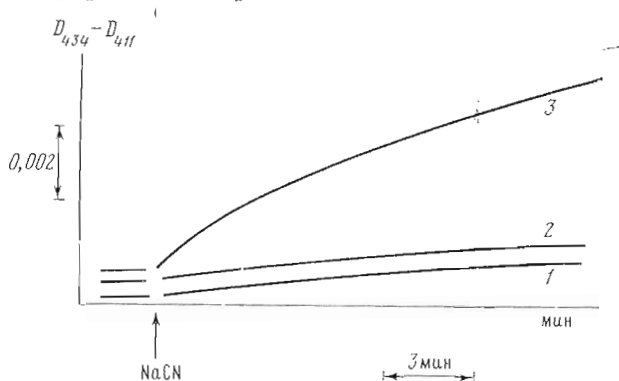


Рис. 7. Кинетика реакции окисленной цитохромоксидазы с цианидом в протеолипосомах без цитохрома *c* (1), нагруженных цитохромом *c* (2) и в протеолипосомах, нагруженных цитохромом *c* в присутствии 2 мкМ внешнего цитохрома *c* (3). Протеолипосомы (0,12 мк белка/мл) инкубировали в среде, содержащей 0,3 М сахарозу, 30 мМ MOPS, 200 мкМ $K_3[Fe(CN)_6]$, pH 7,2

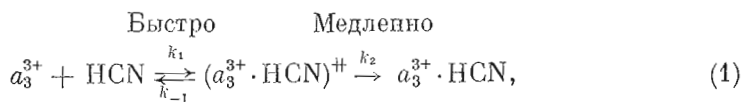
цитохромоксидазы [29], повышает потенциал полувосстановления гема *a* по отношению к гему *a₃* в условиях, когда образуется истинный комплекс цитохрома *c* с цитохромоксидазой [30], стимулирует окисление цитохромоксидазой ряда высокопотенциальных доноров электронов: тетрахлорбензохинона [31], $[Fe(CN)_6]^{4-}$ [32]. Интересно, что последний эффект может быть вызван не только цитохромом *c*, но и рядом других поликатионов. Все эти данные, однако, касаются окислительно-восстановительных свойств цитохромоксидазы. Описанная нами в этой и предыдущей [23] работах стимуляция реакции окисленной цитохромоксидазы с цианидом, окисленным цитохромом *c*, представляет, по-видимому, наиболее ясный пример специфического взаимодействия между этими двумя компонентами дыхательной цепи, не связанного с редокс-превращениями.

*Природа интермедиата и механизм pH-зависимости в реакции феррицитохрома *a₃* с цианидом.* В условиях всех проводившихся нами экспериментов кинетика образования комплекса окисленной цитохромоксидазы с цианидом описывалась уравнением Михаэлиса — Менгера и соответственно могла быть формально охарактеризована параметрами K_m и k_{max} . Изменения хода реакции под влиянием сдвига pH, добавления цитохрома *c*, встраивания фермента в мембрану затрагивали в основном величину K_m . Ясно, что интерпретация этих эффектов существенно зависит от смысла, который имеет параметр K_m в рамках различных кинетических моделей процесса.

Важная особенность реакции феррицитохрома *a₃* с цианидом состоит в том, что, хотя Михаэлисовская кинетика спектральных изменений свидетельствует о возникновении промежуточного продукта, последний, однако, не обнаруживается в спектрах оптического поглощения реакционной смеси [12], выявляющих лишь два компонента на протяжении всего хода реакции — исходную форму окисленного «покоящегося» фермента и конечный комплекс $a_3^{3+} \cdot CN^-$. Как было отмечено Ван-Бууреном и др. [12],

наблюдаемая кинетика взаимодействия цитохрома a_3 с цианидом может объясняться по меньшей мере двумя механизмами.

Механизм А. Цианид (точнее, HCN) связывается со свободным ферментом в быстрой обратимой реакции, образуя промежуточный комплекс, который не отличим по спектру поглощения от «покоящейся» окисленной цитохромоксидазы. Это промежуточное соединение медленно и практически необратимо превращается в конечный стабильный комплекс, образование которого и регистрируется спектрофотометрически:

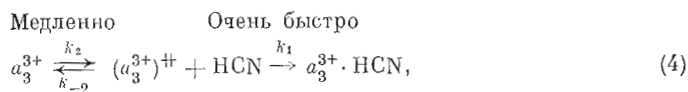


$$K_m = \frac{k_{-1} + k_2}{k_1} \simeq \frac{k_{-1}}{k_1} = K_s, \quad (2)$$

$$k_{\text{макс}} = k_2. \quad (3)$$

Природа промежуточного комплекса $(a_3^{3+} \cdot \text{HCN})^\ddagger$, постулируемого механизмом А, неясна; отсутствие спектральных изменений при его образовании означает, что вряд ли речь может идти о взаимодействии лиганда с гемом. Можно указать на некоторую аналогию с реакциями связывания СО с миоглобином [33] и восстановленной цитохромоксидазой [34, 35], для которых предполагалось существование точек предварительного присоединения лиганда внутри белковой глобулы. Обсуждалась, в частности, возможность того, что предварительное связывание СО в миоглобине осуществляется дистальным гистидином [33]. В связи с этой неопределенностью обсуждение эффектов рН, цитохрома c и мембранного окружения на величину K_m реакции цитохрома a_3^{3+} с HCN в рамках механизма А затруднительно.

Механизм В. «Покоящаяся» форма окисленной цитохромоксидазы инертна по отношению к цианиду, однако небольшая доля фермента [$k_2 \ll k_{-2}$ в уравнении (4)] за счет теплового равновесия находится в особом «активированном» конформационном состоянии $(a_3^{3+})^\ddagger$, с которым и реагирует лиганд.



$$K_m = \frac{k_{-2} + k_2}{k_1} \simeq \frac{k_{-2}}{k_1}, \quad (5)$$

$$k_{\text{макс}} = k_2. \quad (6)$$

В этом случае собственно образование комплекса $a_3^{3+} \cdot \text{HCN}$ — простая бимолекулярная реакция, а промежуточным соединением является «активированное» состояние фермента.

Константы скоростей в уравнениях (1) и (4) пронумерованы так, что при насыщающих концентрациях цианида максимальная скорость реакции (V) в обоих случаях определяется «каталитической константой» (k_2) медленной ($\sim 0,02 \text{ с}^{-1}$) конформационной перестройки фермента — либо свободного (механизм В), либо в предварительном комплексе с цианидом (механизм А).

В работе Ван-Буурена и др. [12] предпочтение было отдано механизму А, и эта точка зрения была принята без обсуждения в исследованиях других авторов [15, 16]. Мотивируя свой выбор, Ван-Буурен и др. [12] указали, что для окисленной цитохромоксидазы уже известен нестабильный конформер — «окисгенированная» форма, спектр поглощения которой заметно отличается от спектра «покоящегося» фермента [14]; в связи с этим обстоятельством предположение о существовании еще одного конформационного состояния фермента, идентичного по своим спектральным свойствам покоящейся форме, представлялось авторам работы [12] маловероятным. Однако, согласно механизму В, $(k_1 + k_{-2}) \gg k_2$ и концентрация интермедиата $(a_3^{3+})^\ddagger$ может быть весьма низка, так что обнаружить его

вклад в спектр поглощения реакционной смеси вряд ли реально. Поэтому нет оснований утверждать, что в рамках механизма *B* спектр поглощения цитохрома (a_3^{3+})[#] совпадает с таковым обычной окисленной формы. Напротив, представляется разумным предположить, что состояние (a_3^{3+})[#] соответствует одной из форм «окисгенированной» или «активированной» цитохромоксидазы [36], т. е. конформера, существование которого достоверно установлено [14, 19]. В этой связи интересно отметить, что в отличие от «покоящейся» формы «окисгенированная» цитохромоксидаза образует комплекс с цианидом в быстрой бимолекулярной реакции без каких-либо признаков насыщения вплоть до концентрации HCN 75 мМ [18], как это и предполагается для интермедиата (a_3^{3+})[#] во второй стадии реакции (4).

Вариант *B* позволяет говорить о несколько более конкретных механизмах наблюдаемых эффектов. В этом случае изменения K_m при не слишком варьирующей величине $k_2 = k_{\text{макс}}$ связаны с влиянием действующих факторов на k_{-2} либо на k_1 , причем k_1 имеет смысл константы скорости обычной бимолекулярной реакции связывания лигандов с железом гема. Кинетика таких реакций подробно изучена как на модельных соединениях, так и в гемопротеидах [1]. В частности, описанная зависимость от pH K_m реакции цианида с окисленной цитохромоксидазой в рамках модели *B* может быть сведена к pH-зависимости k_1 , характеризующей непосредственно присоединение HCN к Fe(III) гема a_3 в «активированной» форме фермента. Среди механизмов, посредством которых белковое окружение может влиять на реакцию железа в высокоспиновых гемопротеидах с лигандами, особенно часто обсуждают роль так называемых дистальных групп белка, т. е. аминокислотных остатков, расположенных вблизи гема со стороны отсутствующей или занятой слабым лигандом 6-й аксиальной координационной связи [1, 3, 4, 37, 38, 39].

Можно выделить три основных момента в действии дистальных групп на взаимодействие гема с лигандами:

1) дистальные остатки перекрывают путь, по которому лиганд попадает из среды внутрь полости белковой глобулы, в которой связан гем (см. подробно [38, 39]);

2) дистальная группа подходит к железу гема настолько близко, что возникают стерические затруднения в связывании 6-го лиганда (например, искажение угла связи CO с железом в гемоглобине [40]);

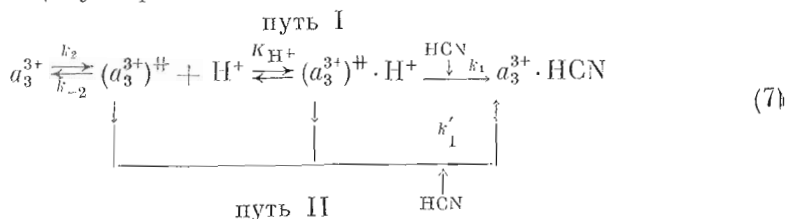
3) образуется водородная связь между дистальным остатком и лигандом, координированным по 6-му аксиальному положению, как это, например, показано для азидо-метмиоглобина [41].

Очевидно, протонирование-депротонирование и сопряженное с ним изменение заряда и конфигурации дистальных групп может оказывать сильное воздействие на связывание HCN с феррицитохромом a_3 в любом из этих случаев. Можно, приняв в качестве модели активированной конформации цитохрома a_3^{3+} структуру метмиоглобина, рассмотреть вариант, когда железо в геме a_3^{3+} связано по 6-му аксиальному положению с молекулой воды [16, 42]*. В этом случае лимитирующей стадией связывания лиганда может быть диссоциация молекулы воды. Увеличение pH вызывает переход акваферрипорфиринов в «щелочную» форму, обусловленный ионизацией связанной воды и возникновением значительно более стабильного комплекса Fe(III)·ОН⁻. Подобный переход, подробно исследованный на большом числе метмиоглобинов и модельных соединений [1, 44], может в принципе объяснить наблюдаемое снижение скорости связывания цианида с гемом a_3^{3+} при защелачивании [15, 16]. Если же активный центр цитохрома a_3 хорошо изолирован от среды, то скорость связывания цианида может лимитироваться проникновением лиганда в карман, в котором спрятан гем. В этом случае протонирование одной из дистальных групп белка может открывать доступ к железу гема. Меха-

* В «покоящейся» цитохромоксидазе в шестом координационном положении гема a_3 находится атом серы [43].

низм такого рода, по-видимому, реализуется в случае пероксидазы хрена [37].

Мы обнаружили, что зависимость реакции цитохрома a_3^{3+} с HCN от протонирования группы белка с $pK_a \sim 6,6$ практически отсутствует в очищенной цитохромоксидазе, но может быть восстановлена добавлением цитохрома с либо встраиванием фермента в мембрану. При объяснении этих данных следует учесть, что восстановление pH-зависимости в обоих случаях сопровождалось уменьшением K_m реакции по цианиду, особенно при кислых pH. Можно допустить, что кроме реакции цианида с протонированной формой фермента возможно связывание лиганда и по второму пути, не зависящему от pH.



Согласно схеме (7),

$$v = d[a_3^{3+} \cdot HCN]/dt \propto k_1 [(a_3^{3+})^{\ddagger} \cdot H^+] + k'_1 \{[(a_3^{3+})^{\ddagger}] + [(a_3^{3+})^{\ddagger} \cdot H^+]\} \tag{8}$$

(возможно также, что реакция по пути II идет с участием лишь депротонированной формы фермента, т. е.

$$v \propto k_1 [(a_3^{3+})^{\ddagger} \cdot H^+] + k'_1 [(a_3^{3+})^{\ddagger}].$$

В присутствии цитохрома с, а также в мембранном ферменте $k_1 \gg k'_1$ и скорость реакции в доступном исследованию интервале pH определяется первым членом уравнения (8), т. е. реакция протекает по H^+ -зависимому пути I.

Можно допустить, что pH-зависимый путь I сохраняется и в выделенном ферменте, но происходит резкое падение k_1 , которая становится сравнимой с k'_1 . В результате снижение скорости реакций по пути I при защелачивании, начиная с некоторого pH, когда $k_1 [(a_3^{3+})^{\ddagger} \cdot H^+] < k'_1 [(a_3^{3+})^{\ddagger}]$, перестает оказывать влияние на суммарную скорость процесса.

Аналогичное рассуждение может быть проведено и в рамках механизма A (уравнение (1)).

Экспериментальная часть

Реактивы. Аскорбиновая кислота, цитохром с (тип VI), азолектин (фосфатидилхолин, тип II-S), холевая кислота, карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразон, валиномицин, а также используемые pH-буферы были фирмы Sigma (США). Холевая кислота была перекристаллизована из раствора в 70%-ном этаноле, обработанного активированным углем. Дезоксихолевая кислота (reinst) — фирмы Calbiochem (США), цианид натрия (Analar) и сульфат аммония (Aristar) — фирмы «BDH» (Англия).

Препараты. Ультразвуковые субмитохондриальные частицы получали из тяжелых митохондрий сердца быка согласно Бейеру [45]. Цитохром-с-оксидаза выделяла из митохондрий сердца быка по методу Фаулера и др. [46] с последующей очисткой полученного препарата по Мак-Леннану и др. [47]. Очищенный фермент содержал около 8 нмоль гема а на 1 мг белка. Содержание гема определяли по разностному спектру поглощения фермента в восстановленной и окисленной формах, используя коэффициент экстинкции $\Delta \epsilon = \epsilon_{630} - \epsilon_{630} = 27 \cdot 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [48]. Концентрацию белка в препаратах определяли биуретовым методом.

Встраивание цитохромоксидазы в липосомы. Цитохромоксидазные липосомы были приготовлены согласно методике Рэкера [49] путем удаления холата диализом из раствора, содержащего в конечном объеме 2,5 мл

100 мг азолектина, 2 мМ сульфат магния, 2%-ный холат калия и 3,6 мг цитохромоксидазы в соответствующем буфере. Предварительное озвучивание этой суспензии, не содержащей белка, проводили в течение 2–3 мин (с интервалами по 30 с) на ультразвуковом генераторе Braun-Sonic-1510 (ФРГ), снабженном микроаконечником. Продолжительность диализа против буфера, не содержащего детергент, составляла 16–18 ч.

Скорость потребления кислорода протеолипосомами, измеренная полярографически в среде, содержащей 50 мМ KH_2PO_4 (рН 7,5), 6,7 мМ аскорбат и 75 мкМ цитохром с при добавлении 5 мкМ карбонилцианид-*m*-хлорфенилгидразона и 1 мкг/мл валиномицина, возрастала в 2,5–3,0 раза относительно контроля.

Измерения. Спектрофотометрические измерения были выполнены на спектрофотометрах Hitachi-356 (Япония) и Aminco DW-2 (США) в кюветках с оптическим путем 1 см, термостатированных при 27–28°C, при постоянном перемешивании реакционной смеси с помощью магнитной мешалки. За образованием комплекса окисленной цитохромоксидазы с цианидом следили по увеличению разности поглощения при 434 и 411 нм, запуская процесс добавлением лиганда. Константы скорости этой реакции определяли путем линейаризации кинетических кривых псевдопервого порядка согласно модифицированному методу Гуггенгейма [50, 51].

Буферные среды. В опытах по связыванию цианида с выделенным ферментом использовали буферные среды, содержащие в зависимости от изучаемой области рН 0,1 М MES, MOPS, HEPES или трис, а также 0,5%-ный твин 80. В случае субмитохондриальных частиц среда инкубации, содержащая те же буферы в концентрации 30 мМ и 0,3 М сахарозу, для поддержания цитохромоксидазы в окисленном состоянии была дополнена 3 мкМ ротеиноном и 0,1 мМ феррицианидом. Такие же буферные среды, но не содержащие ротеинона, были использованы при изучении связывания цианида с окисленной цитохромоксидазой, встроеной в липосомы.

ЛИТЕРАТУРА

1. Antonini B., Brunori M. In: Hemoglobin and myoglobin in their reactions with ligands. Amsterdam: North Holland, 1971.
2. Coryell C. D., Pauling L. J. Biol. Chem., 1940, v. 132, № 2, p. 769–779.
3. George P., Hanania G. I. H. Farad. Soc. Disc., 1955, v. 20, № 20, p. 216–224.
4. George P., Lyster R. L. J. Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 1958, v. 44, № 10, p. 1013–1029.
5. Theorell H., Ehrenberg A. Acta chem. scand., 1951, v. 5, № 6, p. 823–848.
6. Hayashi Y., Yamada H., Yamazaki I. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 427, № 2, p. 608–616.
7. Skulachev V. P. Ann. N. Y. Acad. Sci., 1974, v. 227, p. 188–202.
8. Константинов А. А. Докл. АН СССР, 1975, т. 220, № 3, с. 736–739.
9. Papa S. Biochim. et biophys. acta, 1976, v. 456, № 1, p. 39–84.
10. Wikström M., Krab K. Biochim. et biophys. acta, 1979, v. 549, № 2, p. 177–222.
11. van Buuren K. J. H., Zuurendonk P. F., van Gelder B. F., Muijers A. O. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 256, № 2, p. 243–257.
12. van Buuren K. J. H., Nicholls P., van Gelder B. F. Biochim. et biophys. acta, 1972, v. 256, № 2, p. 258–276.
13. Antonini E., Brunori M., Greenwood C., Malmström B. G., Rotilio G. Eur. J. Biochem., 1971, v. 23, № 2, p. 396–400.
14. Lemberg M. R. Physiol. Rev., 1969, v. 49, № 1, p. 48–51.
15. Wilson D. F., Erecinska M., Brocklehurst E. S. Arch. Biochem. and Biophys., 1972, v. 151, № 1, p. 180–187.
16. Андреев И. М., Арцабанов В. Ю., Константинов А. А., Скулачев В. П. Докл. АН СССР, 1979, т. 244, № 4, с. 1013–1017.
17. Константинов А. А. Докл. АН СССР, 1977, т. 237, № 3, с. 713–716.
18. Brittain T., Greenwood C. Biochem. J., 1976, v. 155, № 2, p. 453–455.
19. Nicholls P., Chance B. In: Molecular mechanisms of oxygen activation / Ed. Hayashi O. N. Y.: Acad. Press, 1974, p. 479–534.
20. Nicholls P., Hildebrandt V. Biochem. J., 1978, v. 173, № 1, p. 65–72.
21. Karlsson B., Lanne B., Malmström B. G., Berg G., Ekholm R. FEBS Lett., 1977, v. 84, № 2, p. 291–295.
22. Maurel F., Donzon P., Waldmann J., Yonetani T. Biochim. et biophys. acta, 1978, v. 525, № 2, p. 314–324.
23. Андреев И. М., Мякотина О. Л., Попова Е. Ю., Константинов А. А. Биохимия, 1983, т. 48, № 2, с. 482–489.
24. Racker E. J. Membrane Biol., 1972, v. 10, № 3/4, p. 221–235.

25. Carroll R. C., Racker E. J. *Biol. Chem.*, 1977, v. 252, № 20, p. 6981-6990.
26. Eytan C. D., Broza R. J. *Biol. Chem.*, 1978, v. 253, № 9, p. 3196-3202.
27. Casey R. P., Chappel J. B., Azzi A. *Biochem. J.*, 1979, v. 182, № 1, p. 149-156.
28. Wrigglesworth J. M., Nicholls P. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 547, № 1, p. 36-45.
29. Tiesjema R. H., Muijsers A. O., van Gelder B. F. *Biochim. et biophys. acta*, 1973, v. 305, № 1, p. 19-28.
30. Schroedl N. A., Hartzell C. R. *Biochemistry*, 1977, v. 16, № 23, p. 4966-4971.
31. Jacobs K. F., Andrews E. C., Crane F. L. In: *Oxidases and related redox systems* / Eds King T. E., Mason H. S., Morrison M. N. Y.: Wiley, 1965, v. 2, p. 784-803.
32. Krab K., Slater E. C. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 547, № 1, p. 58-69.
33. Austin R. H., Beeson K., Eisenstein L., Fraunfelder H., Gunsalus I. C. *Biochemistry*, 1975, v. 14, № 24, p. 5355-5373.
34. Sharrock M., Yonetani T. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 434, № 2, p. 333-344.
35. Sharrock M., Yonetani T. *Biochim. et biophys. acta*, 1977, v. 462, № 3, p. 718-730.
36. Oriti Y., King T. E. J. *Biol. Chem.*, 1976, v. 251, № 23, p. 7487-7493.
37. Morishima I., Ogawa S., Yonezawa T. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 537, № 2, p. 293-303.
38. Case D. A., Karplus M. J. *Mol. Biol.*, 1979, v. 132, № 3, p. 343-368.
39. Tucker P. W., Philipps S. E. W., Perutz M. F., Houtchens R., Caughey W. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1978, v. 75, № 3, p. 1076-1080.
40. Collman J. F., Brauman J. I., Halbert T. R., Suslick K. S. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, 1976, v. 73, № 10, p. 3333-3337.
41. Stryer L., Kendrew J. C., Watson H. C. J. *Mol. Biol.*, 1964, v. 8, № 1, p. 96-104.
42. Lanne B., Malmström B. G., Vanngard T. *Biochim. et biophys. acta*, 1979, v. 545, № 2, p. 205-214.
43. Powers L., Chance B., Ching Y., Angiolillo B. *Biophys. J.*, 1981, v. 34, № 3, p. 465-498.
44. McGrath T. M., La Mar G. M. *Biochim. et biophys. acta*, 1978, v. 534, № 1, p. 99-111.
45. Beyer R. *Methods in Enzymology*, 1967, v. 10, p. 186-194.
46. Fowler L. R., Richardson S. H., Hateji Y. *Biochim. et biophys. acta*, 1962, v. 64, № 1, p. 170-173.
47. MacLennan D. H., Tzagoloff A. *Biochim. et biophys. acta*, 1965, v. 96, № 1, p. 166-168.
48. Nicholls P., Petersen L. C., Miller M., Hansen F. B. *Biochim. et biophys. acta*, 1976, v. 449, № 2, p. 188-196.
49. Hinkle P. C., Kim J. J., Racker E. J. *Biol. Chem.*, 1972, v. 247, № 4, p. 1338-1339.
50. Frost A. A., Pearson R. G. In: *Kinetics and Mechanism*. N. Y.: Wiley, 1961, p. 49.
51. Березин И. В., Клецов А. А. *Практический курс химической и ферментативной кинетики*. М.: МГУ, 1976, с. 22.

Поступила в редакцию
27.VII.1982

REACTION OF FERRIC CYTOCHROME OXIDASE WITH CYANIDE. EFFECTS OF pH, CYTOCHROME *c*, AND MEMBRANE ENVIRONMENT

ANDREEV I. M., KONSTANTINOV A. A.

*A. N. Belozersky Laboratory of Molecular Biology and Bioorganic Chemistry,
M. V. Lomonosov State University, Moscow*

Binding of HCN with ferric beef heart cytochrome oxidase has been studied in submitochondrial particles, as with the enzyme solubilized in detergent or reconstituted into proteoliposomes. Under all conditions, the reaction proceeds via an intermediate and its kinetics can be described by formal parameters K_m and k_{max} in keeping with the Michaelis-type equation. K_m of the reaction strongly depends on the enzyme environment; thus it increases 100-1000 fold upon solubilization of cytochrome oxidase but can be subsequently decreased by incorporation of the enzyme in liposomes and by addition of cytochrome *c*. pH-dependence of the reaction rate shows that, in submitochondrial particles and proteoliposomes as well as in the case of solubilized enzyme supplement with cytochrome *c*, HCN specifically binds the form of cytochrome oxidase in which a heme-linked ionizable group with pK_a 6,5-6,9 is protonated.