



УДК 577.02:577.158.1

## ТЕОРЕТИЧЕСКИЙ АНАЛИЗ РЕДОКСЗАВИСИМОГО ПРОТОНИРОВАНИЯ ГЕМА *a* И $\text{Cu}_A$ В ЦИТОХРОМ-*c*-ОКСИДАЗЕ С СО-ИНГИБИРОВАННЫМ БИЯДЕРНЫМ ЦЕНТРОМ

© 2003 г. Ю. И. Георгиевский\*, Э. С. Медведев\*\*#, А. А. Стучебрюхов\*

\* Химический факультет Калифорнийского университета, Дэвис, США;

\*\* Институт проблем химической физики РАН, 142432, г. Черноголовка Московской обл.

Поступила в редакцию 11.12.2001 г. Принята к печати 26.02.2002 г.

В одном из предложенных механизмов функционирования цитохром-*c*-оксидазы (ЦО) постулируется, что элементом, перекачивающим протоны через мембрану, является гем *a*. Принято считать, что для реализации этого механизма должен иметь место значительный захват (выброс) протонов при восстановлении (окислении) гема *a*. Недавно сообщалось о двух прямых измерениях захвата и выброса протонов при восстановлении и окислении гема *a* в смешанно-валентном состоянии СО-ингибированной ЦО. В данной статье развит общий формализм для интерпретации таких экспериментов и обсуждаются результаты этих экспериментов. Предлагается контрольный эксперимент для проверки выводов, сделанных в предыдущих работах.

*Ключевые слова:* цитохромоксидаза, редокс-центры, захват и выброс протонов.

### ВВЕДЕНИЕ

Цитохром-*c*-оксидаза (ЦО) – терминальный фермент электрон-транспортной цепи дыхательной системы митохондрий и некоторых бактерий. Она работает как протонный насос, который использует свободную энергию восстановления кислорода для транслокации протонов через внутреннюю мембрану митохондрии, создавая тем самым электрохимический протонный градиент между матриксом митохондрии (внутренняя среда) и цитозольной стороной мембраны (внешняя среда). Протонный градиент, создаваемый этим и другими насосами вдоль электрон-транспортной цепи, используется впоследствии для проведения синтеза АТФ. Структура ЦО как из бактериальных, так и животных клеток недавно была описана [1–5], однако молекулярный механизм трансмембранного переноса протонов неизвестен.

Ранее было выдвинуто два механизма трансмембранного переноса. Один из них, предложенный М. Викстромом с сотр. (см. последнюю версию в работе [6]), основан на так называемом гистидиновом цикле. В нем постулируется, что при связывании кислорода один из His-лигандов  $\text{Cu}_B$  временно диссоциирует от иона металла и действует как молекулярный переключатель-переносчик протонов аналогично молекуле ретиналя в бактериородопсине. Другой механизм, которому в прошлом многие авторы отдавали предпочте-

ние (см., например, [7]), основан на предположении, что главным элементом является гем *a*. Недавно Г. Михель [8, 9] детально описал гипотетическую схему каталитического цикла и механизма переноса, в которых гем *a* играет ключевую роль.

Мутационные данные показывают, что и так называемые “химические”, и переносимые протоны поставляются через два протонпроводящих канала цитохромоксидазы – К- и D-каналы [10–15]. Обсуждается также возможность существования третьего, Н-канала [3], однако недавно проведенный анализ показал, что этот канал, по-видимому, не участвует в транслокации протонов [16].

Данные свидетельствуют о том, что лишь один, максимум два протона проходят через К-канал [14, 17]. Этот канал связывает матрикс с биядерным центром и, скорее всего, не является “сквозным” [10]. Таким образом, если двухканальная модель правильна, то остальные шесть или даже семь протонов должны идти по второму – D-каналу. Если предположить, что главный элемент протонного насоса находится в биядерном центре, то все эти шесть-семь протонов должны переноситься к биядерному центру. Последний, таким образом, должен разрешить чрезвычайно трудную проблему разделения химических и переносимых протонов в каталитическом цикле и обеспечения согласованной подачи протонов, одного за другим, по мере поступления электронов к биядерному центру для восстановления кислорода, одновременно предотвращая утечку протонов через этот канал.

Сокращение: ЦО – цитохром-*c*-оксидаза.

# Автор для переписки (тел./факс: (095) 124-62-97; эл. почта: esmedved@orc.ru).

Модель с гемом *a* [7–9] представляется менее сложной, а заложенные в ней физические принципы преобразования энергии более прозрачны. Здесь переносимые протоны, которые первоначально могут двигаться по тому же D-каналу, что и химические протоны, очевидным образом отделяются от последних и направляются в область вблизи гема *a*, а не к биядерному центру – месту назначения химических протонов. Чередующиеся акты восстановления и окисления гема *a* при прохождении электронов по цепи редокс-центров приводят к чередующимся актам протонирования (предположительно с внутренней стороны мембраны) и депротонирования (предположительно по направлению к внешней стороне) в соответствии с принципом зарядовой компенсации. Этот механизм естественным образом дал бы ответ на интригующий вопрос о роли гема *a* в функционировании ЦО.

В свете вышесказанного чрезвычайно важно установить, какой из двух механизмов, или какой-либо иной, реализуется этим ферментом.

Принято считать, что если гем *a* является основным элементом насоса, то должно наблюдаться существенное связывание или высвобождение протонов соответственно при его восстановлении или окислении. Редоксзависимое протонирование гема *a* экспериментально проявляется в изменении его потенциала полувосстановления ( $E_m$ ) при изменении pH и в редокс-эффекте Бора. Для ЦО без лигандов были получены значения  $E_m/\text{pH} = 30\text{--}60$  мВ на единицу pH в различных митохондриях [7, 18] и в растворе [19], что соответствует связыванию в среднем 0.5–1 протона на один восстановленный гем. Было показано [20], что эти протоны берутся, главным образом, из матрикса. Для ЦО с CN-лигандом, который стабилизирует гем  $a_3$  в окисленном состоянии, было получено значение 30 мВ/ед. pH [7, 21, 22] – и здесь протоны берутся из матрикса. Напротив, в присутствии CO-лиганда, который стабилизирует гем  $a_3$  и  $\text{Cu}_B$  в восстановленных состояниях, значения  $E_m/\text{pH}$  очень малы, порядка 10 мВ/ед. pH [23–26], а протоны берутся, в основном, с положительно заряженной стороны мембраны.

Прямые измерения суммарного эффекта Бора, обусловленного действием всех центров, показали [27], что примерно  $2.4 \text{ H}^+$  связываются при полном восстановлении полностью окисленной ЦО. При полном восстановлении смешанно-валентного состояния комплекса ЦО–CO, в котором  $\text{Cu}_A$  и гем *a* окислены, связывалось  $0.4 \text{ H}^+$ , из чего заключили, что приблизительно  $0.4 \text{ H}^+$  связывается при восстановлении пары гем *a*/ $\text{Cu}_A$ . Аналогичные результаты были получены при окислении фермента без лигандов и с лигандом CO. Восстановление комплекса ЦО–CN приводило к связыванию  $1.6 \text{ H}^+$ .

Недавно две группы исследователей выполнили новые измерения эффекта Бора в CO-ингиби-

рованной ЦО и получили весьма противоречивые результаты. М. Викстрем с сотр. [28] нашли, что при окислении гема *a* не наблюдается заметного выброса протонов – в среднем всего  $0.3 \text{ H}^+$  на один окисленный гем. С другой стороны, С. Папа и др. [29–32] утверждают, что до  $0.9$  протона связывается (высвобождается) в каждом акте восстановления (окисления); более того, их измерения в липосомах показывают, что протоны берутся из внутренней среды и выбрасываются с наружной стороны мембраны. Однако наличие сильной связи протонов с гемом противоречит как собственным результатам группы С. Папа, так и результатам цитированных выше предыдущих экспериментов. Напротив, результаты группы М. Викстрема согласуются с наблюдаемой слабой зависимостью редокс-потенциала гема *a*, и эти авторы делают вывод, что гем *a* не является основным элементом насоса. Но их результаты также содержат ряд неопределенностей, которые несомненно должны быть прояснены, чтобы получить строгое доказательство того, что гем *a* не является основным элементом насоса.

В данной статье мы предлагаем теоретическую модель редоксзависимого протонирования двух центров белковой молекулы и обсуждаем ее применимость для объяснения экспериментальных результатов работ [28–32]. Мы также предлагаем контрольный эксперимент, который устранил бы некоторые неясности в интерпретации экспериментальных данных работы [28].

## ТЕОРЕТИЧЕСКАЯ МОДЕЛЬ РЕДОКСЗАВИСИМОГО ПРОТОНИРОВАНИЯ ДВУХ ЦЕНТРОВ

*А. Определения. Редокс-центры  
и окислительный эквивалент*

В экспериментах полностью восстановленный связанный с CO фермент, находящийся в растворе или встроенный в липосомы, окисляется малыми количествами добавляемого окислителя, такого, как феррицианид. Биядерный центр всегда остается полностью восстановленным, так что окисляются только редокс-центры гема *a* и  $\text{Cu}_A$  (см., однако, [33]). Степень окисления гема *a* и  $\text{Cu}_A$  измеряется методом абсорбционной спектроскопии с временным разрешением; параллельно с этими измерениями следят за изменением pH раствора (с внешней стороны липосом в случае встроенного фермента). Однако временное разрешение измерений pH очень низкое, порядка одной секунды. Ниже будет показано, что хотя окислительные реакции протекают значительно быстрее, кинетика окисления может существенно влиять на результаты измерений. Измерения pH калибруются путем добавления известного количества HCl и наблюдения за вызываемыми изменениями pH; тогда из измеренных изменений pH можно определить среднее число выброшен-

ных (захваченных) протонов в расчете на одну молекулу при различных степенях окисления (восстановления). Ниже предлагается теоретический подход, который можно применять для описания таких экспериментов.

Полное число молекул ЦО  $N_{tot}$  можно записать в виде суммы

$$N_{tot} = N_0 + N_1 + N_2, \quad (1)$$

где  $N_0, N_1, N_2$  – числа молекул ЦО<sup>0</sup>, ЦО<sup>1+</sup> и ЦО<sup>2+</sup>, т. е. неокисленных и, как мы будем говорить, одно- и двухэлектронно окисленных по отношению к полностью восстановленному ферменту.

Окислительный эквивалент  $Q$ , т. е. число электронов, взятых у ансамбля полностью восстановленных ферментов, равен

$$Q = 2N_2 + N_1. \quad (2)$$

Введем соответствующие относительные числа молекул и перепишем формулы (1) и (2) в виде

$$n_0 + n_1 + n_2 = 1, \quad (3)$$

$$q = 2n_2 + n_1, \quad (4)$$

где  $n_0 = N_0/N_{tot}$ ,  $n_1 = N_1/N_{tot}$ ,  $n_2 = N_2/N_{tot}$  и  $q = Q/N_{tot}$ .

Для одноэлектронно окисленных молекул ЦО<sup>1+</sup> отношение числа молекул, в которых Cu<sub>A</sub> восстановлен, а гем *a* окислен, к числу молекул, в которых Cu<sub>A</sub> окислен, а гем *a* восстановлен ( $w$ ), дается формулой

$$w = \exp\left(\frac{E_c - E_h}{kT}\right), \quad (5)$$

где  $E_c$  и  $E_h$  – соответственно редокс-потенциалы Cu<sub>A</sub> и гема *a*, а тепловая энергия  $kT = 25$  мВ при комнатной температуре.

Степень окисления гема *a*,  $s_h$ , которую измеряют спектроскопическим методом [28–30], можно записать в виде

$$s_h = n_2 + \frac{w}{1+w}n_1. \quad (6)$$

Аналогично, степень окисления Cu<sub>A</sub>,  $s_c$ , можно записать как

$$s_c = n_2 + \frac{1}{1+w}n_1. \quad (7)$$

Используя формулу (4), удобно переписать формулы (6) и (7) в виде

$$s_h = 0.5 \left[ q - \frac{1-w}{1+w}n_1 \right], \quad (8)$$

$$s_c = 0.5 \left[ q + \frac{1-w}{1+w}n_1 \right]. \quad (9)$$

Из формулы (8) видно, что отклонение зависимости  $s_h$ – $q$  от линейного вида определяется долей

молекул ЦО<sup>1+</sup>, т. е.  $n_1$ , которая является нелинейной функцией от  $q$  (см. ниже) и через  $w$  зависит от разности редокс-потенциалов Cu<sub>A</sub> и гема *a*.

Для описания выброса протонов при окислении ЦО удобно ввести дополнительные параметры  $p_1$  и  $p_2$ , которые соответствуют средним числам выброшенных протонов в расчете на одну молекулу ЦО соответственно при одноэлектронном (ЦО<sup>0</sup> → ЦО<sup>1+</sup>) и двухэлектронном (ЦО<sup>0</sup> → ЦО<sup>2+</sup>) окислении. Число протонов, выброшенных при одноэлектронном окислении, можно записать так:

$$p_1 = \frac{p_c + wp_h}{1+w}, \quad (10)$$

где  $p_c$  и  $p_h$  – соответственно числа протонов, выброшенных в результате окисления меди и гемного железа при восстановленном состоянии второго центра. Если предположить, что депротонирование этих двух центров происходит независимо, т. е. число протонов, выброшенных при окислении одного из них не зависит от редокс-состояния другого, то

$$p_c + p_h = p_2. \quad (11)$$

Однако в общем случае это не так (см. обсуждение ниже). Параметры  $p_c$  и  $p_h$  не зависят от относительных редокс-потенциалов Cu<sub>A</sub> и гема *a*.

Полное число протонов, выброшенных при окислении одной молекулы ЦО, можно записать так:

$$p = p_1n_1 + p_2n_2 = p_2(n_2 + p_{12}n_1), \quad (12)$$

где  $p_{12} = p_1/p_2$ . Аналогично формуле (8) его можно выразить через окислительный эквивалент и населенность ЦО<sup>1+</sup>,

$$p = 0.5p_2[q + (2p_{12} - 1)n_1]. \quad (13)$$

Как и в случае с  $s_h$ , зависимость  $p$  от  $q$  будет нелинейна из-за присутствия члена с  $n_1$ , если только не выполнено условие  $p_{12} = 0.5$ . Последнее всегда справедливо, если Cu<sub>A</sub> и гем *a* депротонируются независимо друг от друга и их редокс-потенциалы одинаковы. Действительно, в этом случае  $w = 1$  из формулы (5),  $p_1 = (p_c + p_h)/2$  из формулы (10) и  $p_{12} = 0.5$  из формулы (11).

Измеренное число протонов, выброшенных при окислении одного гема *a*, зависит от экспериментальных условий. Если окислитель последовательно добавляют малыми порциями и раствор тщательно перемешивают до начала каждого окисления, как описано в [28], то число протонов, выброшенных при каждом шаге окисления, деленное на долю гема *a*, окисленного на том же шаге, дается производной  $dp/ds_h$ . Однако, если на каждом шаге окислительный эквивалент добавляют большими порциями, вплоть до количества,

требуемого для полного окисления гема  $a$  и  $\text{Cu}_A$  (как в работе [30]), то измеряется  $p/s_h$ .

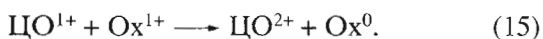
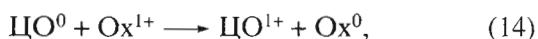
Из формул (8) и (13) видно, что  $dp/ds_h$  и  $p/s_h$  не будут зависеть от  $q$ , как наблюдалось в работе [28], только в двух случаях: когда либо  $n_1 \approx 0$ , либо  $w \approx 1$  ( $p_{12} \approx 0.5$ ), так как  $n_1$  есть нелинейная функция от  $q$ . Качественно ясно, что  $n_1$  возрастает от нуля при малых  $q$  до максимального значения при  $q \approx 1$ , и затем снова уменьшается до нуля при приближении  $q$  к его максимальному значению 2.

Чтобы получить количественные зависимости  $s_h$  и  $p$  от степени окисления системы, необходимо найти явную зависимость доли одноэлектронно окисленных молекул от добавленного окислительного эквивалента  $q$ . Это будет сделано в двух предельных случаях: когда скорость обмена электронами между молекулами в разных состояниях окисления через общие промежуточные редокс-агенты велика на временной шкале эксперимента, и в противоположном случае, когда она мала.

#### Б. Медленное установление равновесия между окисленными молекулами (кинетический режим)

Здесь мы будем предполагать, что к моменту начала измерений не успевает установиться статистическое равновесие между окисленными молекулами с разным числом электронов. Другими словами, мы рассматриваем случай, когда установление редокс-равновесия происходит медленно на временной шкале эксперимента. Тогда относительные населенности молекул в разных состояниях окисления определяются кинетикой самого процесса окисления.

Кинетика окисления описывается следующими уравнениями:



В предположении, что редокс-потенциал окислителя (Оx) намного выше, чем у ЦО, и обратные реакции не идут, можно написать следующие кинетические уравнения:

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{dt} &= -k_0 n_0 n_x, \\ \frac{dn_1}{dt} &= k_0 n_0 n_x - k_1 n_1 n_x, \\ \frac{dn_2}{dt} &= k_1 n_1 n_x, \end{aligned} \quad (16)$$

где  $n_x$  — концентрация окислителя в его окисленном состоянии,  $k_0$  и  $k_1$  — бимолекулярные константы скоростей соответственно реакций (14) и (15). Вводя новую независимую переменную

$$u = \int_0^t n_x(\tau) d\tau,$$

перепишем систему уравнений (16) в виде

$$\begin{aligned} \frac{dn_0}{du} &= -k_0 n_0, \\ \frac{dn_1}{du} &= k_0 n_0 - k_1 n_1, \\ \frac{dn_2}{du} &= k_1 n_1. \end{aligned} \quad (17)$$

Решение системы (17) имеет вид

$$\begin{aligned} n_0 &= e^{-k_0 u}, \\ n_1 &= \frac{k_0}{k_0 - k_1} (e^{-k_1 u} - e^{-k_0 u}), \end{aligned} \quad (18)$$

а  $n_2$  вычисляется по формуле (3). Для удобства перепишем формулы (3), (4) и (18) в виде

$$\begin{aligned} n_1 &= \frac{k_0}{k_0 - k_1} (n_0^{k_1/k_0} - n_0), \\ q &= 2 - n_1 - 2n_0. \end{aligned} \quad (19)$$

Подставляя теперь  $n_0$  из второго уравнения в первое, мы получим  $n_1$  как неявную функцию от  $q$ . Эта функция будет зависеть от отношения  $k_1/k_0$ .

Чтобы найти  $k_1/k_0$ , предположим, что время контакта молекулы окислителя Оx и молекулы ЦО при их столкновении намного короче, чем время переноса электрона между  $\text{Cu}_A$  и гемом  $a$ . В этой ситуации перенос электрона от молекулы ЦО к молекуле окислителя возможен лишь при условии, что  $\text{Cu}_A$  восстановлен в момент столкновения. Поэтому  $k_1$  пропорциональна доле молекул ЦО<sup>1+</sup>, в которых  $\text{Cu}_A$  восстановлен,

$$\frac{k_1}{k_0} = \frac{w}{1+w}, \quad (20)$$

где  $w$  определяется формулой (5). В противоположном пределе, когда время столкновения велико по сравнению с временем переноса электрона между  $\text{Cu}_A$  и гемом  $a$ , разумно предположить, что  $k_1/k_0 \approx 1$ .

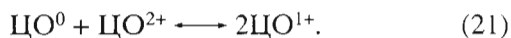
Используя формулы (5), (19) и (20), можно найти зависимость степени окисления гема  $a$  ( $s_h$ ) от окислительного эквивалента  $q$  (формула (8)) для различных возможных значений редокс-потенциалов  $\text{Cu}_A$  и гема  $a$ . Когда потенциал гема намного выше, чем  $\text{Cu}_A$ , из формулы (20) получаем  $k_1 \ll k_0$ . В этом случае добавление окислителя вначале будет приводить к появлению только ЦО<sup>1+</sup>, но не ЦО<sup>2+</sup>, до тех пор, пока  $q$  не станет больше единицы. Таким образом, при  $q < 1$  имеем  $n_0 \approx 1 - q$ ,  $n_1 \approx q$  и  $n_2 \approx 0$ . При  $q \approx 1$  населенность ЦО<sup>0</sup> исчезает, и при  $q > 1$  получается  $n_0 \approx 0$ ,  $n_1 \approx 2 - q$  и  $n_2 \approx q - 1$ .

На рис. 1 показаны типичные зависимости населенностей  $n_0$ ,  $n_1$  и  $n_2$  от степени окисления. Этот рисунок демонстрирует уже упоминавшуюся важную особенность:  $n_1$ , населенность состояния ЦО<sup>1+</sup>, является нелинейной функцией  $q$  и практически никогда не равна нулю. Поэтому, чтобы  $s_h$ , степень окисления гема *a*, была линейной функцией окислительного эквивалента  $q$ , параметр  $w$  должен быть близок к единице, т.е. редокс-потенциалы  $Su_A$  и гема *a* должны быть одинаковы (см. формулы (5) и (8)). Этот вывод иллюстрируется рис. 2, где приведена зависимость степени окисления гема *a* от  $q$  при разных значениях редокс-потенциалов  $Su_A$  и гема *a*; там же показаны экспериментальные данные из работы [28]. Видно, что согласие с экспериментом может быть достигнуто лишь в том случае, если потенциалы примерно равны, в пределах 10 мВ.

На рис. 3 приведены зависимости числа выброшенных протонов  $p$  и производная  $dp/ds_h$  от  $q$  при нескольких значениях потенциалов  $Su_A$  и гема *a*; там же показаны экспериментальные данные из работы [28]. Здесь предполагалось, что два центра протонируются независимо (см. формулу (11)). Как видно, предположения о равенстве потенциалов и независимости протонирования двух центров приводят к идеальному согласию с экспериментом. Следует отметить, что в противоположность результатам на рис. 3б выброс протонов на рис. 3а относительно нечувствителен к разности потенциалов. Аналогичные результаты получаются для восстановления ЦО<sup>2+</sup> сильным восстановителем.

### В. Быстрое установление равновесия между окисленными молекулами (равновесный режим)

Теперь обратимся к случаю, когда обмен электронами между молекулами в различных состояниях окисления совершается быстро, так что редокс-равновесие успевает установиться к моменту измерения. Тогда населенности  $n_0$ ,  $n_1$  и  $n_2$  определяются равновесными свойствами ансамбля и не зависят от кинетики окисления. Реакция обмена электронами между молекулами с разной степенью окисления описывается уравнением



В равновесии

$$\frac{n_0 n_2}{n_1^2} = K, \quad (22)$$

где константа равновесия  $K$  выражается через редокс-потенциалы  $E_c$  и  $E_h$  и потенциал взаимодействия  $\Delta E$ , который равен уменьшению потен-

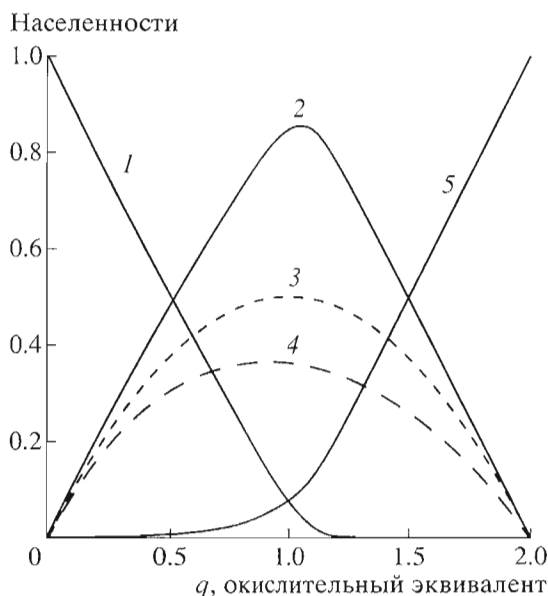


Рис. 1. Кинетический режим. Зависимость населенностей ЦО<sup>0</sup> ( $n_0$ , (1)), ЦО<sup>1+</sup> ( $n_1$ , (2–4)) и ЦО<sup>2+</sup> ( $n_2$ , (5)) от добавленного окислительного эквивалента (формулы (3) и (19)).  $k_1/k_0 = 0.05$  (1, 2, 5), 0.5 (3), 1 (4).

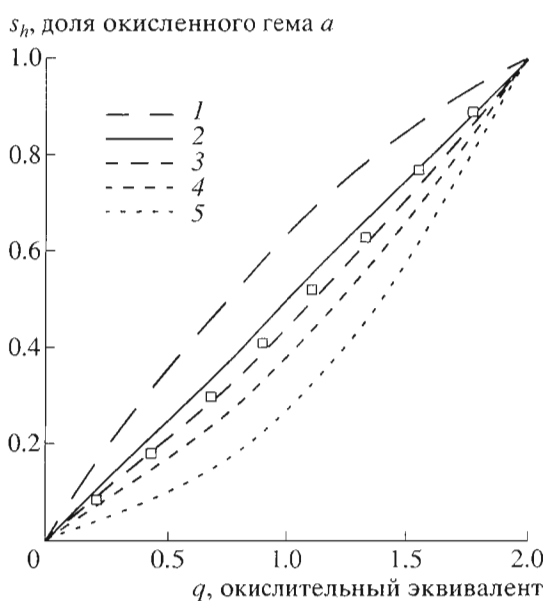
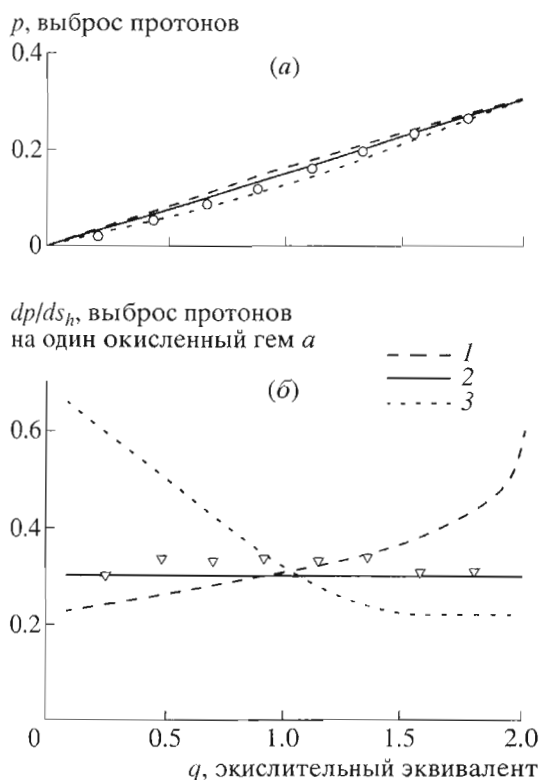


Рис. 2. Кинетический режим. Зависимость доли окисленного гема *a* от добавленного окислительного эквивалента (формула (8)).  $E_c - E_h = -40$  (1),  $-20$  (2),  $-10$  (3),  $0$  (4),  $40$  (5) мВ.  $k_1/k_0$  рассчитано по формуле (20). Квадраты – экспериментальные данные [28].

циала одного центра при восстановлении другого [25, 26],

$$K = \frac{e^{(E_c + E_h - \Delta E)/kT}}{(e^{E_c/kT} + e^{E_h/kT})^2} = \frac{e^{-\Delta E/kT}}{w + 1/w + 2}. \quad (23)$$



**Рис. 3.** Кинетический режим, условие (11) выполняется. Суммарный выброс протонов на одну молекулу ЦО (*a*, формулы (13) и (19)) и выброс протонов на один окисленный гем *a* (*b*, формулы (8), (13) и (19)) при добавлении малых порций окислителя.  $E_c - E_h = 40$  (1), 0 (2),  $-40$  (3) мВ. Для всех кривых  $p_c = 0.1$ ,  $p_h = 0.2$ ,  $p_2 = 0.3$ .  $k_1/k_0$  рассчитано по формуле (20). Кружки и треугольники – экспериментальные данные [28].

Используя формулы (3), (4) и (22), мы получаем следующее выражение для  $n_1$ :

$$n_1 = \frac{1 - \sqrt{1 - (1 - 4K)q(2 - q)}}{1 - 4K}. \quad (24)$$

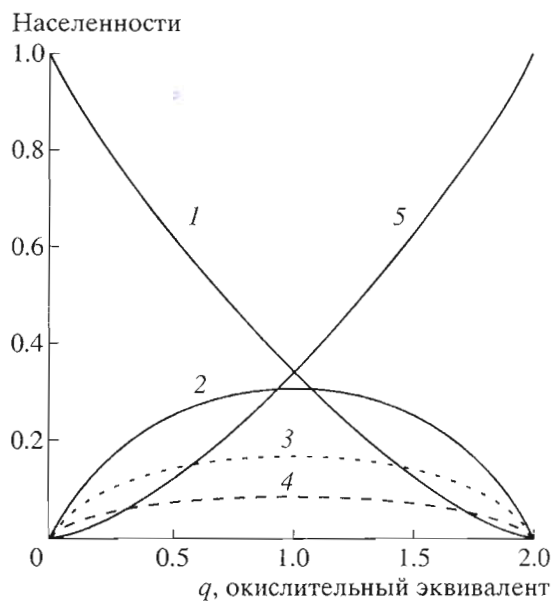
Если имеется сильное антикооперативное взаимодействие между  $\text{Cu}_A$  и гемом *a*, т. е.  $\Delta E \gg kT$ , или если редокс-потенциалы сильно различаются,  $|E_c - E_h| \gg kT$ , мы получаем  $K \ll 1$ . В этом случае

$$n_1 \approx \begin{cases} q, & 0 < q < 1, \\ 2 - q, & 1 < q < 2. \end{cases} \quad (25)$$

В случае же сильного кооперативного взаимодействия между центрами,  $\Delta E \ll -kT$ , и при близких значениях потенциалов,  $w \approx 1$ , мы получаем  $K \gg 1$  и

$$n_1 \approx 0. \quad (26)$$

Равновесные населенности  $n_0$ ,  $n_1$  и  $n_2$  приведены на рис. 4. Важным результатом здесь является то, что  $n_1$  приближается к нулю только в случае сильного кооперативного взаимодействия двух ре-



**Рис. 4.** Равновесный режим. Зависимость населенностей  $\text{ЦО}^0$  ( $n_0$ , (1)),  $\text{ЦО}^{1+}$  ( $n_1$ , (2–4)) и  $\text{ЦО}^{2+}$  ( $n_2$ , (5)) от добавленного окислительного эквивалента (формулы (3), (22–24)).  $E_c - E_h = 0$ ,  $\Delta E = -40$  (1, 2, 5),  $-80$  (3),  $-120$  (4) мВ. Отрицательные значения  $\Delta E$  соответствуют кооперативному взаимодействию.

док-центров. Такая ситуация, по-видимому, не-реальна [25, 26].

#### ПРИЛОЖЕНИЕ ТЕОРЕТИЧЕСКОЙ МОДЕЛИ К ОПИСАНИЮ РЕДОКСЗАВИСИМОГО ПРОТОНИРОВАНИЯ ГЕМА *a* И $\text{Cu}_A$ В ЦИТОХРОМ-*c*-ОКСИДАЗЕ

Следует подчеркнуть, что данная теория не претендует на объяснение абсолютных количеств связываемых и выбрасываемых протонов, а имеет целью описать зависимость их числа от величины окислительного эквивалента, добавленного в систему. Сильное различие результатов, полученных группами М. Викстрема и С. Папа, выражается не только в абсолютных значениях выброса протонов в объем, но и в их зависимости от степени окисления. Именно это последнее и служит предметом анализа в представленной теории.

Из материала предыдущих разделов должно быть ясно, что кинетика окисления является важным фактором, если только до начала измерений в системе не успеет установиться полное редокс-равновесие<sup>1</sup>. В режиме, контролируемом кинетикой, зависимости от скоростей нетривиальны.

<sup>1</sup> В работе [30] измерения проводились с интервалом около 10 с, а редокс-равновесие достигалось лишь за 3 мин. В работе [28] интервал между последовательными измерениями составлял несколько минут и не приведено данных о скорости установления равновесия.

Например, изменение скоростей окисления  $k_0$  и  $k_1$  в нашей модели может не приводить к заметному эффекту. Действительно, результат зависит только от отношения этих скоростей, которое может быть постоянным при весьма общих условиях (см. формулу (20) и сопутствующее обсуждение). Экспериментально наблюдалось<sup>2</sup>, что выброс протонов и окисление гема не изменяются при ускорении реакции. Это означает, что либо успевает установиться равновесие, либо реакция контролируется кинетикой, но отношение  $k_1/k_0$  постоянно.

На левой панели рис. 3 в работе [28] показана линейная зависимость степени окисления гема *a* ( $s_h$ ) от величины добавленного окислительного эквивалента  $q$ . Полученная там зависимость выброса протонов  $p$  от  $q$  также оказалась линейной, и поэтому производная  $dp/ds_h$  не зависит от  $q$  (см. рис. 2 и 3 настоящей статьи).

Оба эти результата объясняются нашей моделью. Мы показали, что линейная зависимость степени окисления гема *a* от количества добавленного окислителя (формула (8)) может наблюдаться только в двух случаях. В первом из них редокс-потенциалы  $\text{Cu}_A$  и гема *a* практически одинаковы и  $w = 1$ . Другая возможность ( $n_1 = 0$ ) могла бы быть реализована только в случае, когда быстро устанавливается редокс-равновесие и имеется кооперативное взаимодействие центров (см. формулы (23–26) и рис. 4). Последнее, однако, маловероятно, так как тщательные измерения С. Чена с сотр. [25, 26] показали, что имеет место сильное антикооперативное взаимодействие. (Отметим, что условие  $n_1 = 0$  могло бы быть выполнено также при отсутствии пространственного перемешивания добавляемого окислителя в реакционном объеме за время проведения эксперимента. В таком случае даже малое количество добавленного окислителя приводит к его высокой локальной концентрации, и поэтому все молекулы ЦО в области инъекции окислителя полностью окисляются, т.е.  $n_1 = 0$ . Однако этого не происходит в условиях эксперимента [28], где были приняты специальные меры для приготовления гомогенной смеси до начала реакции.)

Если редокс-потенциалы  $\text{Cu}_A$  и гема *a* действительно одинаковы, то второй результат группы М. Викстрема, а именно линейную зависимость числа протонов от окислительного эквивалента  $q$ , можно объяснить, привлекая дополнительное предположение, что протонирование двух центров происходит независимо друг от друга; иными словами, редокс-состояние одного центра не влияет на протонирование другого. В этом случае число протонов, выброшенных при образовании молекул  $\text{ЦО}^{2+}$ , равно сумме выбросов протонов, связанных с окислением каждого из центров (см.

формулу (11)). С другой стороны, так как  $w = 1$ , число протонов при одноэлектронном окислении равно  $p_1 = (p_h + p_c)/2$  (см. формулу (10)). Следовательно,  $p_{12} = p_1/p_2 \approx 1/2$  и в этом случае  $p = 0.5q$  (см. формулу (13)), т.е.  $p$  есть линейная функция от  $q$ . Ее производная не зависит от  $q$ , что и наблюдалось М. Викстромом с сотр. [28].

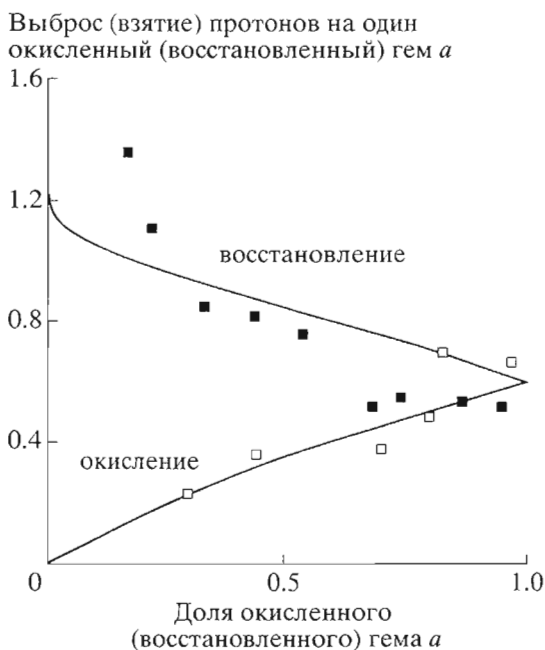
Итак, чтобы объяснить результаты работы [28], необходимо сделать два предположения: 1) совпадение редокс-потенциалов и 2) независимость протонирования  $\text{Cu}_A$  и гема *a*. Первое предположение, возможно, выполняется; так, по данным работы [29], разница потенциалов при тех значениях рН, где они измерены одновременно, не превышает 5 мВ (в работах [25, 26] получено 15 мВ). Второе предположение правдоподобно, но противоположный случай, когда центры взаимозависимы, также вполне вероятен (см. ниже).

Совпадение потенциалов  $\text{Cu}_A$  и гема *a* с высокой точностью (менее половины  $kT$ ), необходимое для объяснения результатов М. Викстрема с сотр. [28], вызывает определенные сомнения. В самом деле, такое совпадение хотя и не исключается, но кажется весьма маловероятным, если только нет особых причин для этого. Почему эти два потенциала должны так точно совпадать в этом более или менее искусственном (с присоединенным СО) состоянии фермента?

По нашему мнению, было бы полезно провести дополнительные измерения с мутантным ферментом, где потенциал либо  $\text{Cu}_A$ , либо гема *a* будет изменен. Если наша интерпретация правильна, то поведение гема *a* при окислении должно стать сильно нелинейным, как предсказывает наша модель.

В рамках данной модели мы не смогли полностью объяснить зависимости относительного числа протонов, выброшенных (связанных) при окислении (восстановлении) гема *a*, наблюдавшиеся в экспериментах С. Папа с сотр. [29–32], хотя некоторые особенности можно воспроизвести, если сделать предположения, отличные от предположений М. Викстрема с сотр. [28]. Главное предположение, которое необходимо теперь сделать, состоит в том, что редокс-центры действуют сообща, а не независимо, при выбросе и связывании протонов. В этом случае число протонов, выброшенных при двухэлектронном окислении ( $p_2$ ), не будет равно сумме протонов, связанных с каждым из центров ( $p_c$  и  $p_h$ ), т.е. формула (11) неприменима. Например, в одном из возможных сценариев вообще нет выброса протонов при одноэлектронном окислении [30]. Другими словами, протоны не высвобождаются до тех пор, пока не окислятся оба центра, т.е.  $p_c$  и  $p_h$  равны нулю. Однако  $p_2$  не равно нулю; в частности, С. Папа с сотр. дают величину  $p_2 = 0.6–0.9$ .

<sup>2</sup> М.И. Верховский, личное сообщение.



**Рис. 5.** Кинетический режим, условие (11) не выполняется. Суммарное количество выброшенных (связанных) протонов на один окисленный (восстановленный) гем *a* в зависимости от степени окисления (восстановления) гема (формулы (8), (13) и (19)).  $p_c = p_h = 0$ ,  $p_2 = 0.6$ ,  $w = 1.3$ . Квадраты – экспериментальные данные [30].

На рис. 5 показана зависимость выброса (связывания) протонов на один окисленный (восстановленный) гем *a* от степени окисления (восстановления) гема, рассчитанная при разумных значениях параметров (для процесса окисления это зависимость  $p/s_h$  от  $s_h$ , а для процесса восстановления – зависимость  $(p_2 - p)/(1 - s_h)$  от  $1 - s_h$ ); там же приведены экспериментальные данные С. Папа с сотр. [30]. Видно, что модель воспроизводит качественную тенденцию.

Мы приходим к выводу, что результаты М. Викстрема и С. Папа по отдельности могут быть поняты в рамках предложенной модели при разумных предположениях, но эти предположения в двух случаях кардинально различаются. Поэтому необходимы дальнейшие экспериментальные исследования, чтобы прояснить поднятые в данной статье вопросы.

#### БЛАГОДАРНОСТИ

Выражаем благодарность М. Викстрему, М.И. Верховскому (Университет Хельсинки), В. Вудруфу (Калифорнийский университет) и А.А. Константинову (МГУ) за стимулирующие дискуссии. Работа была поддержана грантами Национальных институтов здоровья США (GM54052-02), Международным центром Фогарти при НИЗ

США (1 R03 TW00954-01), ИНТАС (99-00281) и Российским фондом фундаментальных исследований (01-03-33261). А. А. Стучебрюхов благодарит за поддержку фонды Слоана и Бекмана.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yano R., Yoshikawa S. // *Science*. 1995. V. 269. P. 1069–1074.
2. Tsukihara T., Aoyama H., Yamashita E., Tomizaki T., Yamaguchi H., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yano R., Yoshikawa S. // *Science*. 1996. V. 272. P. 1136–1144.
3. Yoshikawa S., Shinzawa-Itoh K., Nakashima R., Yano R., Yamashita E., Inoue N., Yao M., Fei M.J., Libeu C.P., Mizushima T., Yamaguchi H., Tomizaki T., Tsukihara T. // *Science*. 1998. V. 280. P. 1723–1729.
4. Iwata S., Ostermeier C., Ludwig B., Michel H. // *Nature (London)*. 1995. V. 376. P. 660–669.
5. Abramson J., Riistama S., Larsson G., Jasaitis A., Swenson-Ek M., Laakkonen L., Puustinen A., Iwata S., Wikström M. // *Nature Struct. Biol.* 2000. V. 7. P. 910–920.
6. Wikström M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1458. P. 188–198.
7. Artztbanov V.Y., Konstantinov A.A., Skulachev V.P. // *FEBS Lett.* 1978. V. 87. P. 180–185.
8. Michel H. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. P. 15129–15140.
9. Michel H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 12819–12824.
10. Mills D., Florens L., Hiser C., Quian J., Ferguson-Miller S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1458. P. 180–187.
11. Brzezinski P., Ädelroth P. // *J. Bioenerg. Biomembr.* 1998. V. 30. P. 99–107.
12. Aagaard A., Gilderson G., Mills D.A., Ferguson-Miller S., Brzezinski P. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 15847–15850.
13. Gennis R.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1998. V. 1365. P. 241–248.
14. Zaslavsky D., Gennis R.B. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1458. P. 164–179.
15. Pfitzner U., Hoffmeier K., Harrenga A., Kannt A., Michel H., Bamberg E., Richter O., Ludwig B. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 6756–6762.
16. Lee H., Das T., Rousseau D.L., Mills D., Ferguson-Miller S., Gennis R.B. // *Biochemistry*. 2000. V. 39. P. 2989–2996.
17. Wikström M., Jasaitis A., Backgren C., Puustinen A., Verkhovsky M.I. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 1459. P. 514–520.
18. Арцатбанов В.Ю., Григорьев В.А., Константинов А.А. // *Биохимия*. 1983. Т. 48. С. 46–53.
19. Blair D.F., Ellis Jr. W.R., Wang H., Gray H.B., Chan S.I. // *J. Biol. Chem.* 1986. V. 261. P. 11524–11537.



20. Арцатбанов В.Ю., Константинов А.А., Скулачев В.П. // Докл. АН СССР. 1976. Т. 228. С. 1222–1225.
21. Арцатбанов В.Ю., Константинов А.А., Скулачев В.П. // Докл. АН СССР. 1977. Т. 237. С. 461–464.
22. Moody A.J., Rich P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1990. V. 1015. P. 205–215.
23. Hinkle P., Mitchell P. // J. Bioenerg. 1970. V. 1. P. 45–60.
24. van Gelder B.F., van Rijn J.L.M.L., Schilder G.J.A., Wilms J. // Structure and Function of Energy-Transducing Membranes / Eds van Dam K., van Gelder B.F. Amsterdam: Elsevier, 1977. P. 61–68.
25. Ellis Jr. W.R., Wang H., Blair D.F., Gray H.B., Chan S.I. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 161–167.
26. Wang H., Blair D.F., Ellis Jr. W.R., Gray H.B., Chan S.I. // Biochemistry. 1986. V. 25. P. 167–171.
27. Mitchell R., Rich P.R. // Biochim. Biophys. Acta. 1994. V. 1189. P. 19–26.
28. Verkhovsky M.I., Belevich N., Morgan J.E., Wikström M. // Biochim. Biophys. Acta. 1999. V. 1412. P. 184–189.
29. Capitanio N., Capitanio G., Minuto M., De Nitto E., Plese L., Nicholls P., Papa S. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 6373–6379.
30. Capitanio N., Capitanio G., Boffoli D., Papa S. // Biochemistry. 2000. V. 39. P. 15454–15461.
31. Papa S., Capitanio N. // J. Bioenerg. Biomembr. 1998. V. 30. P. 109–119.
32. Capitanio N., Vygodina T.V., Capitanio G., Konstantinov A.A., Nicholls P., Papa S. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1318. P. 255–265.
33. Hendler R.W. // J. Bioenerg. Biomembr. 1991. V. 23. P. 805–817.

## A Theoretical Analysis of the Redox-Coupled Protonation of Heme *a* and Cu<sub>A</sub> in the Cytochrome *c* Oxidase with CO-Inhibited Binuclear Center

Yu. I. Georgievskii\*, E. S. Medvedev\*\*#, and A. A. Stuchebyukhov\*

# Phone/fax: +7 (095) 124-6297, e-mail: esmedved@orc.ru

\* Department of Chemistry, University of California, Davis, CA, 95616 USA

\*\* Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences, Chernogolovka, 142432 Russia

One of the proposed mechanisms of functioning of cytochrome *c* oxidase (COX) postulates that heme *a* is the element pumping protons across the membrane. It is generally believed that, to support this mechanism, a substantial proton uptake/release should exist upon heme *a* reduction/oxidation. Two direct measurements of proton uptake/release in oxidation/reduction of heme *a* in CO-bound mixed-valence COX were recently reported. In this paper, we develop a general formalism for the interpretation of such experiments and discuss the results of these experiments. A control experiment is proposed to verify the conclusions made in previous studies. The English version of the paper: *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*, 2003, vol. 29, no. 1; see also <http://www.maik.ru>.

*Key words:* cytochrome *c* oxidase, proton uptake/release, redox centers