



ОБЗОРНЫЕ СТАТЬИ

УДК 577.158.8

ЦИТОХРОМОКСИДАЗА. СТРОЕНИЕ И МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ

Кулиш М. А., Миронов А. Ф.

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

В обзоре представлены современные данные о субъединичном и аминокислотном составе белка, строении простетической группы и роли отдельных составных частей фермента в механизме действия.

Важную роль в процессе клеточного дыхания играют белки, в состав которых в качестве простетической группы входят комплексы порфиринов с железом. Развитие представлений о клеточном дыхании и связь последнего с хромопротеидами показаны в книге Кейлина «История клеточного дыхания и цитохромы» [1].

Особое место в реакциях, обеспечивающих животный и растительный мир энергией, занимает цитохромоксидаза — фермент дыхательной цепи, непосредственно взаимодействующий с кислородом. Изучению свойств, механизму действия и строению цитохромоксидазы посвящено большое количество работ, опубликовано несколько обзоров [2–10], сборников материалов конференций и симпозиумов [11–16]. Несмотря на это, в литературе, за исключением обстоятельного, но уже достаточно устаревшего обзора Лемберга [4], нет материалов, отражающих современные взгляды на структуру и функции фермента.

В настоящем обзоре рассмотрены последние данные по установлению строения цитохромоксидазы, включая доказательства строения гема *a*, определение аминокислотной последовательности отдельных субъединиц и их пространственной организации в ферменте. Значительное место в обзоре уделено изложению материала по механизму действия цитохромоксидазы.

1. СПОСОБЫ ВЫДЕЛЕНИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Цитохромоксидаза прочно связана с мембранами митохондрий. Кроме нее в состав мембраны входят близкие по свойствам ферменты дыхательной цепи и АТФ-синтезирующих комплексов. Наличие в измельченных тканях гемоглобина и миоглобина в количествах, значительно превосходящих содержание цитохромоксидазы, усложняет выделение чистых препаратов фермента. Этому процессу посвящен обзор [17] и глава в работе [4].

Первая стадия выделения цитохромоксидазы включает солиubilизацию фермента. Наиболее часто для этого используют соли желчных кислот. Изучалось действие и других реагентов, таких, как протеолити-

ческие ферменты, змеиный яд, иеионные детергенты, цеолиты, щелочи и спирты, как в отдельности, так и в смеси с солями желчных кислот, но большого распространения они не получили [18].

Широкое применение нашли методы экстракции, предложенные Оку-нуки [19] и Ионетани [20, 21]. Эти методы, однако, обладают рядом недостатков. Наиболее важным из них является использование высоких концентраций холата, что приводит к одновременной экстракции цитохромов, гемоглобина, миоглобина и ряда других белков. Для выделения цитохромоксидазы из такого раствора необходимо многократное переосаждение сульфатом аммония. Проведение этой операции требует значительных затрат времени и не освобождает до конца фермент от примеси цитохрома *b*.

В последние годы описан ряд методик приготовления цитохромоксидазы, принципиально отличающихся от приведенных выше [18, 22—25]. Для выделения используют концентрат субмитохондриальных частиц дыхательной цепи, приготовленный по методике Кейлина — Хартри и не содержащий гемоглобина и миоглобина. С помощью первой экстракции при низкой концентрации холата удаляют цитохром *b* и другие белки. Затем препарат цитохромоксидазы переосаждают и подвергают очистке на колонке с DEAE-целлюлозой [23] или с сефадексами. Для проведения всего процесса требуется 24 ч [18].

Одним из важнейших показателей чистоты выделенного препарата цитохромоксидазы является количество наномолей гема *a* в 1 мг белка. При выделении из измельченной ткани этот показатель равен в среднем 7—8 нмоль/мг [26, 27]. Использование препаратов Кейлина — Хартри повышает отношение до 10—11 нмоль/мг, тогда как имеются сообщения о выделении препаратов фермента с показателем 14—15 нмоль/мг [6, 28].

Широкое применение физико-химических методов исследования ускорило получение препаратов цитохромоксидазы, способных растворяться в буферных растворах без детергентов и обладающих относительно низкой вязкостью [18, 24].

В качестве примесей в препаратах цитохромоксидазы обычно присутствуют липиды и детергенты, применяемые при выделении. Было высказано предположение, что липиды являются необходимыми компонентами и что они входят в состав фермента [29]. В дальнейшем было показано, что содержание липидов можно уменьшить дополнительной очисткой; получены активные препараты цитохромоксидазы, содержащие лишь 5% липидов [30]. При содержании липидов менее 1% активность фермента исчезает, но полностью восстанавливается при добавлении индивидуальных фосфолипидов или их смесей. Детергенты типа эмасол-1130 и твин 80 также оказывают активирующее действие на препараты цитохромоксидазы, лишенные липидов [25].

Детально изучено взаимодействие ионных и неионных детергентов с цитохромоксидазой. Все они связываются с ферментом и замещают часть фосфолипидов, захваченных цитохромоксидазой при выделении. В зависимости от используемого детергента обмену не подвергаются от 6 до 10 молекул липидов на молекулу фермента. Показано, что эти липиды представляют собой главным образом дифосфатидилглицериды и что они не связаны с цитохромоксидазой ковалентными связями. Роль их не определена, а расположение не может быть легко установлено, так как отрыв этих липидов возможен лишь в условиях, приводящих к денатурации фермента [31].

В настоящее время общепризнано, что липиды не играют какой-либо специфической роли в цитохромоксидазе, а лишь облегчают ее связывание с мембраной и, по-видимому, стабилизируют пространственную структуру фермента [25, 31, 32], создавая необходимое для его функционирования гидрофобное окружение.

2. СОСТАВ И СВОЙСТВА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

2.1. Пространственная организация фермента

Цитохромоксидаза представляет собой исключительно сложную систему, состоящую из многих компонентов. В настоящее время общепризнано, что фермент состоит из нескольких белковых субъединиц, двух гемов, двух атомов меди и имеет молекулярный вес порядка 180 000—200 000 для наиболее активной формы.

Наличие примесей усложняет определение молекулярного веса с достаточной точностью. Значительные трудности возникают также из-за склонности цитохромоксидазы к агрегации в отсутствие детергентов. Определению молекулярного веса посвящено несколько работ [18, 23, 26, 27, 33—38], на основании которых можно сделать следующие выводы. В зависимости от применяемого детергента фермент существует в растворе в форме либо тетрамера, либо димера с молекулярным весом ~200 000. Димерная форма в присутствии мочевины или под влиянием щелочной среды диссоциирует, давая мономер с молекулярным весом ~100 000. Наибольшую ферментативную активность цитохромоксидаза проявляет в димерной форме. Активность мономера ниже и составляет 90%. Обработка раствора мономера додецилсульфатом натрия приводит к более глубокому расщеплению. Изучению образующихся полипептидов уделяется значительное внимание [23, 27, 28, 37—50]. Используя различную технику эксперимента, удалось выделить от шести до восьми субъединиц фермента, полученного из различных источников. Функции этих полипептидов пока неизвестны, однако то, что цитохромоксидаза содержит в большинстве случаев одинаковое количество субъединиц (чаще всего семь), позволяет предположить, что они действительно входят в состав фермента (табл. 1).

В некоторых работах [18, 42, 46, 55, 56] сообщалось о выделении из бычьего сердца цитохромоксидазы, состоящей из шести субъединиц. Однако, как показали последующие исследования, эти результаты, по-видимому, получены из-за неполного расщепления субъединиц фермента [47].

Значительные трудности в интерпретации данных различных групп исследователей вызваны применением отличающихся вариантов гелеэлектрофореза. Как было показано [51], порядок выхода полипептидов для трех наиболее распространенных методик не идентичен (табл. 1, № 4—6).

Вариант выделения субъединиц цитохромоксидазы приведен на схеме 1 [49].

Таблица 1

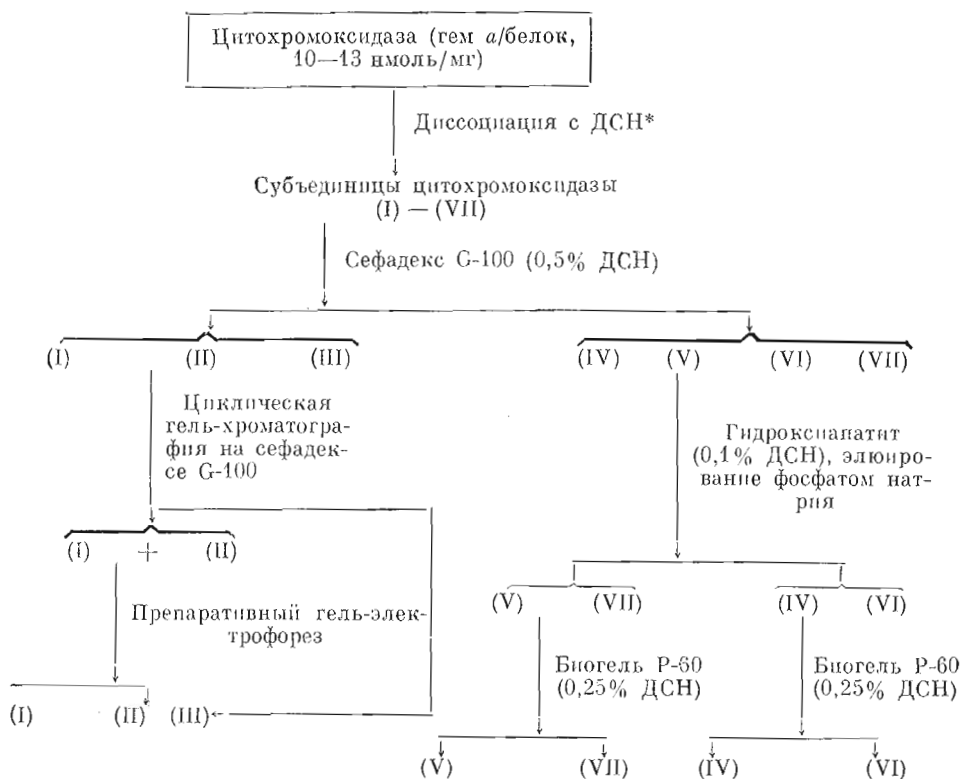
Молекулярные веса субъединиц цитохромоксидазы, выделенной из различных источников

№	Источник выделения	Молекулярные веса отдельных субъединиц								Интерпретация
		I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	
1	Сердце быка	36 000	28 000	19 000	14 000	12 500	11 000	10 000	6 000	[37]
2	То же	36 000	22 500	17 000	12 500	9 700	5 300	—	—	[46]
3	»	35 400	24 100	21 000	16 800	12 400	8 200	4 400	—	[47]
4	»	38 000	19 000	25 000	13 800	6 000	8 600	4 300	—	[51, 52]
5	»	35 300	25 200	21 000	16 200	12 100	6 700	3 400	—	[51, 53]
6	»	33 000	21 300	19 000	14 000	12 500	8 500	4 900	—	[51, 54]
7	Печень крысы	38 000	24 500	20 500	14 400	12 500	10 300	8 500	—	[53]
8	Внутренние мембраны митохондрий дрожжей	43 000	34 000	24 000	14 000	12 000	12 000	4 500	—	[28]
9	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	42 000	34 500	23 000	14 000	12 500	9 500	—	—	[23]
10	»	40 000	27 300	25 000	13 800	13 000	10 200	9 500	—	[45]
11	»	40 000	33 000	22 000	14 500	12 700	12 700	4 600	—	[42]
12	<i>Neurospora crassa</i>	41 000	28 500	21 000	16 000	14 000	11 500	10 000	—	[44]
13	<i>Locusta migratoria</i>	38 000	24 000	19 000	14 500	12 500	10 000	8 000	—	[41]
14	<i>Candida utilis</i>	49 000	32 000	28 000	20 000	13 500	13 500	—	—	[27]

Установлено, что три крупные субъединицы (I—III) синтезируются в митохондриях, а остальные, меньшие по размерам, — в цитоплазме [46, 55, 57, 58]. Последние оказались более кислыми по сравнению с митохондриальными, содержащими в своем составе много неполярных аминокислот.

Применение хроматографии на агарозе, модифицированной *L*-лейцином, позволило отделить от цитохромоксидазы часть гидрофобных

Схема 1



* ДСН — додецилсульфат натрия.

субъединиц, в результате чего был получен препарат фермента, состоящего из пяти субъединиц и обладающего биологической активностью [38]. Обработка такого ферментного комплекса 0,1% раствором додецилсульфата натрия и последующее деление на сефадексе G-200 приводят к отрыву еще одной субъединицы [59]. Полученный комплекс из четырех субъединиц растворим в буферных растворах без детергентов и сохраняет от 30 до 70% активности. Три гидрофобные субъединицы с большим молекулярным весом, по-видимому, облегчают связывание фермента с мембранами и создают благоприятное окружение для его работы.

В настоящее время нет ни единой точки зрения относительно расположения простетических групп в цитохромоксидазе [23, 37—50, 59—65]. Существует мнение, что они включены в самую большую гидрофобную субъединицу [61, 63]. Этому, однако, противоречит тот факт, что удаление из молекулы трех самых больших субъединиц не приводит к потере гемов *a* [59]. Ряд авторов считает, что оба гема *a* связаны с низкомолекулярными цитоплазматическими белками [23, 37, 38, 59]. Изучение спектральных свойств субъединиц также позволяет считать, что простетические группы связаны с четвертой субъединицей [59], близкой по свойствам к цитохрому *c*.

Аминокислотный состав цитохромоксидазы

Аминокислоты	[18]	[36]		[68]	[70]
		до удаления гема, липидов	после уда- ления липи- дов, гемов		
Lys	27-28	42	37	39	37
His	18-20	20	19	30	19
Arg	19-21	27	28	31	32
Asp	52	55	55	60	77
Thr	51-57	42	39	53	59
Ser	53	35	36	54	57
Glu	51-55	53	63	60	65
Pro	47-48	32	30	46	42
Gly	53-54	53	58	59	73
Ala	55-57	56	61	62	66
Cys	7	5	5	7(6)	16
Val	45-47	41	45	51	56
Met	13-15	21	22	35(32)	24
Ile	37-40	37	42	43	46
Leu	76-79	76	78	87	88
Tyr	29	27	27	33	24
Phe	42-43	43	41	47	42
Trp	27-28	44	44	30	8
NH ₃	62-63	111	48	59	74
Число остат- ков	716	820	808	886	905
<i>M</i>	79557	84022	85657	93378	92078

Существует компромиссная точка зрения, согласно которой одна простетическая группа связана с гидрофобной субъединицей I ($M \sim 40\,000$), а другая — с гидрофильной субъединицей V ($M \sim 11\,600$) [50, 64, 65]. Субъединицу V удалось выделить, определить ее спектральные свойства и полную аминокислотную последовательность [65].

Для изучения пространственной организации цитохромоксидазы фермент обрабатывался бифункциональными реагентами, способными ковалентно связывать соседние субъединицы. Последующее расщепление модифицированного фермента и выделение полученных комплексов позволяет сделать выводы о взаимном расположении субъединиц [66]. Использование для этих целей радиоактивных соединений, которые могут вводить в полипептиды ³⁵S, привело к мысли, что субъединицы II, V и VI расположены на внешней стороне митохондриальной мембраны, субъединица III — на внутренней, а субъединицы I и IV — в глубине мембраны [67].

2.2. Аминокислотный состав цитохромоксидазы

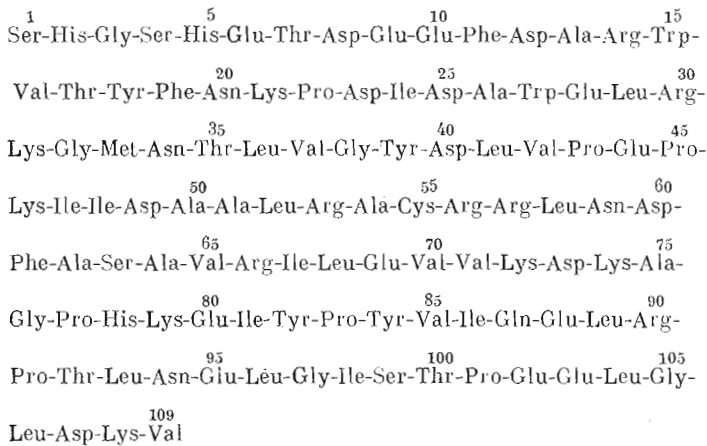
Определению аминокислотного состава цитохромоксидазы посвящено несколько работ [18, 36, 44, 68-70]. Следует отметить, что расхождение в количестве остатков аминокислот, таких, как гистидин, метионин, тирозин и др., связано, вероятно, со степенью очистки фермента, а также его происхождением (табл. 2).

Из табл. 2 видно, что в цитохромоксидазе преобладают гидрофобные аминокислоты, например лейцин; основных аминокислот аргинина и лизина несколько больше, чем аспарагиновой и глутаминовой кислот. Вероятно, часть основных аминокислот находится внутри белковой глобулы или окружена липидами, так как изоэлектрическая точка фермента лежит в интервале pH 4-5 [6]. Наличие цистеиновых остатков вызвало предположение о существовании в цитохромоксидазе дисульфидных связей [71]. В работе [50] показано, что такие связи действительно суще-

ствуют между субъединицами фермента. Шесть тиоловых групп легко реагируют с *n*-хлормеркуробензоатом без потери ферментативной активности. Седьмой остаток цистеина реагирует лишь в присутствии додецилсульфата натрия, что сопровождается потерей активности и удалением меди из молекулы фермента [72].

Деление цитохромоксидазы на субъединицы и их очистка позволяют подойти к определению состава белка ферментного комплекса иным способом. В настоящее время определен аминокислотный состав отдельных субъединиц [37, 44, 47, 50], и в некоторых случаях установлена аминокислотная последовательность [65, 73]. На схеме 2 представлена аминокислотная последовательность гемсодержащей субъединицы цитохромоксидазы [65], для которой показана определенная аналогия с β -цепью гемоглобина.

Схема 2



Дальнейшее определение аминокислотной последовательности всех субъединиц цитохромоксидазы, место расположения гемов и меди позволят решить ряд задач, связанных со строением активного центра фермента и механизмом действия.

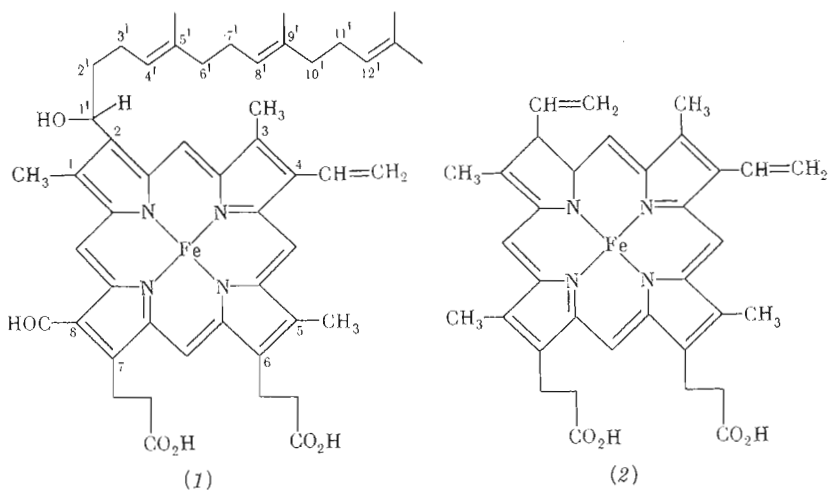
2.3. Протестическая группа цитохромоксидазы

Среди различных компонентов цитохромоксидазы наиболее изучена структура ее протестической группы — гема *a* (1). Гем *a* обычно выделяют из сердечной мышцы крупного рогатого скота, причем наибольшую сложность представляет отделение примесей, таких, как протогем, белки и липиды [4]. В присутствии примесей гем *a* и порфирина *a* крайне неустойчивы.

От наиболее распространенного в природе протогема (2) [74] гем *a* отличается главным образом наличием высшего ненасыщенного заместителя и формильной группы в положениях 2 и 8 порфиринового цикла*.

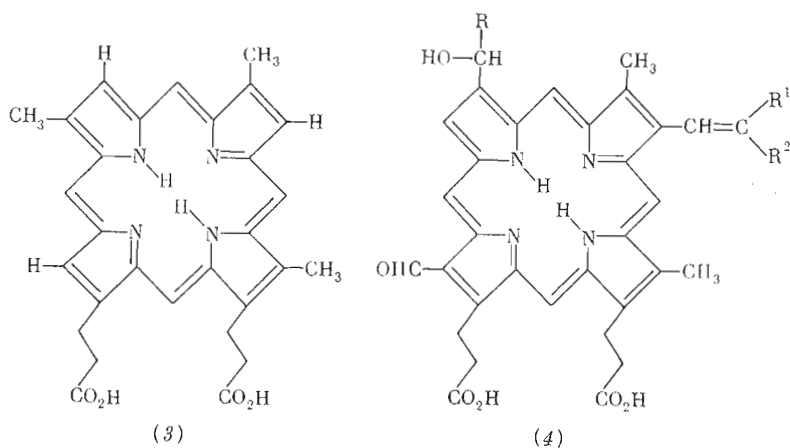
Считают, что большая гидрофобная алкильная группа придает молекуле гема *a* (1) липофильный характер и дает возможность взаимодействовать с гидрофобными белками и липидами. Формильная группа в активной цитохромоксидазе значительно менее реакционноспособна, чем в свободном геме *a*. Учитывая эти факты, Лемберг [76] предположил, что пропионовые остатки и формильная группа гема *a* находятся в глу-

* В работе используется номенклатура порфиринов, предложенная Г. Фишером [75].



бине белковой глобулы, а изопренсидный заместитель — на ее поверхности.

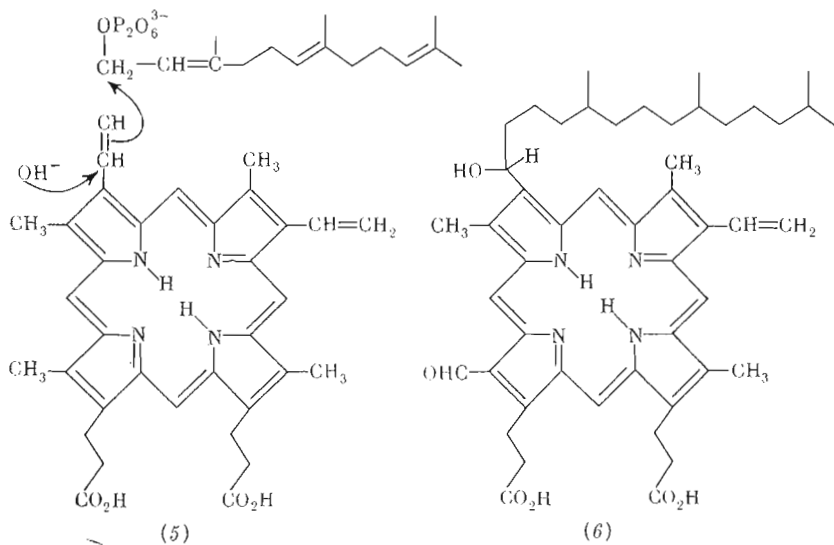
Первые работы по установлению строения гема *a* относятся к 1953 г., когда Варбург и Гевитц подвергли гем резорциновой плавке и получили продукт, названный ими цитодейтеропорфирином. Варбург предположил, что цитодейтеропорфирин является одним из изомеров дейтеропорфирина, однако спектральные свойства и хроматографическая подвижность этих соединений оказались различными. Изучение бромирования цитодейтеропорфирина показало, что в этом соединении имеются три незамещенных β -положения. Присутствие двух пропионовых остатков в молекуле было доказано титрованием и окислительной деградацией [77]. Вскоре был осуществлен синтез всех изомеров порфирина и показано, что цитодейтеропорфирин имеет структуру (3) [78, 79].



Изучение электронных спектров гема *a* и порфирина *a* дало возможность предположить наличие в молекуле формильной группы и ненасыщенного заместителя, сопряженного с порфириновым ядром. Резко выраженный оксо-родо-тип электронного спектра порфирина *a* указывает на расположение этих заместителей в противоположных пиррольных кольцах [80]. Наличие формильной группы доказано рядом химических превращений, в ходе которых образовывались ацетали, оксемы, гидразоны. Этот заместитель может быть окислен до карбоксигруппы, восстановлен до спирта и образует шиффовы основания с аминогруппами белков в ще-

лочной среде. Все эти превращения легко наблюдать по изменениям в электронных и ИК-спектрах [77]. Положение формильной группы в порфириновом кольце доказано работами Пиателли [81] и Клизы [82].

Важным этапом в установлении строения порфирина *a* явились работы Линена. Учитывая, что наиболее вероятный биосинтетический предшественник гема *a* — протопорфирин (5), он предложил возможный путь превращения последнего [83], который включает алкилирование винильной группы в положении 2 фарнезилпирофосфатом или другим аллилпирофосфатом с одновременной атакой образующегося карбониевого иона гидроксидом, восстановлением двойных связей и окислением метильной группы в положении 8.



Для доказательства этого предположения гидрированный порфирин *a* окисляли хромовым ангидридом и в результате была получена смесь малеинимидов. Сравнение этих соединений с малеинимидами известного строения позволило установить, что в насыщенном порфирине *a* имеется остаток гексагидрофарнезилэтилового спирта [84]. Аналогичные результаты были получены при изучении гема *a*, выделенного из дрожжей [85]. В результате этих работ для порфирина *a* была предложена структура (6). Лемберг предположил, что в алкильном заместителе имеются две двойные связи [86].

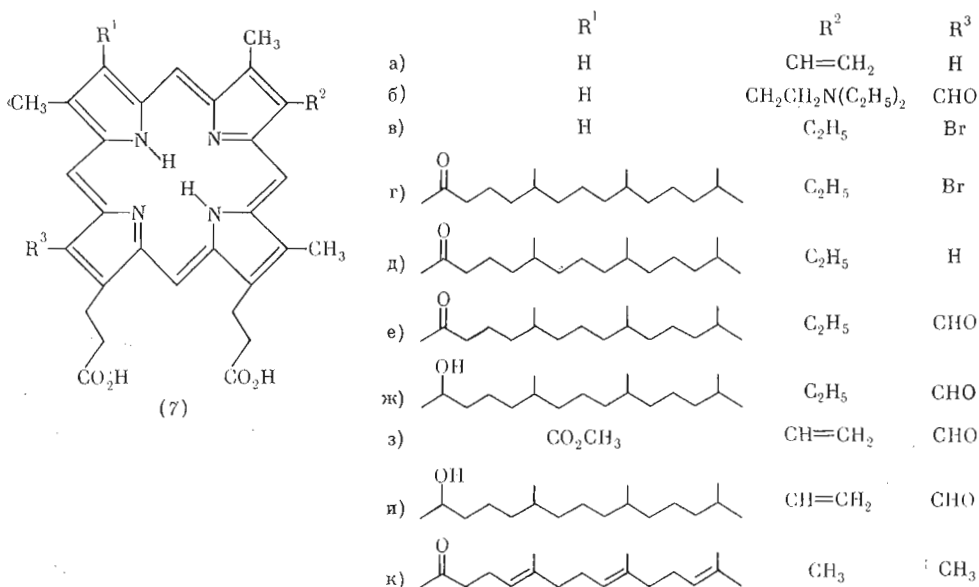
Значительный вклад в установление строения гема *a*, главным образом с помощью физико-химических методов, внес Койхи [87–90]. Суммировав все данные по масс-спектрометрии, ПМР, ИК- и электронной спектроскопии, Койхи пришел к выводу, что гем *a* представляет собой железный комплекс 1,3,5-триметил-4-винил-2-(1-окси-5,9,13-триметил-4,8,12-*транс*, *транс*-тетрадекатриенил)-6,7-ди(2-карбоксиэтил)-8-формилпорфирина (1). При проведении этерификации была отмечена повышенная реакционная способность концевой двойной связи при C12' по сравнению с двойными связями при C8' и C4'.

Высказанная первоначально этим автором мысль о существовании в геме *a* гексозамина состава $C_6H_{11}NO_4$, присоединенного гликозидной связью по α -углеродному атому фарнезилэтилового заместителя [87, 88], в дальнейшем не подтвердилась [90].

Структуру (1) подтверждает исследование гема *a*, выполненное с помощью жидкостной хроматографии высокого давления и масс-спектрометрии с десорбцией ионов в электрическом поле [91].

Для окончательного установления строения гема *a*, а также выяснения механизма действия этого соединения в последние годы ведутся широкие исследования по синтезу порфирина *a*, его насыщенных аналогов и производных цитодейтеропорфирина. Сложность синтеза подобных соединений связана с отсутствием в их составе симметричного дипиррольного фрагмента, а также наличием ряда лабильных заместителей.

Среди существующих методов получения природных порфиринов один из наиболее перспективных основан на последовательном наращивании дипирролилметанов в трипиррены-*a* и биладлены-*a*, *c* и циклизации последних в порфирины [92–94]. Этим методом осуществлен синтез ряда замещенных цитодейтеропорфиринов (7а–д), содержащих заместители, имеющиеся в порфирине *a* и его гидрированных производных [94–97]. Синтезирован порфирин (7е) [98], восстановление ацильной группы которого до спиртовой, легко протекающее под действием боргидрида натрия [99], приводит к насыщенному аналогу порфирина *a* (7ж). Разработан метод введения высших ненасыщенных ацильных заместителей в молекулу порфирина (7к) [95, 96].



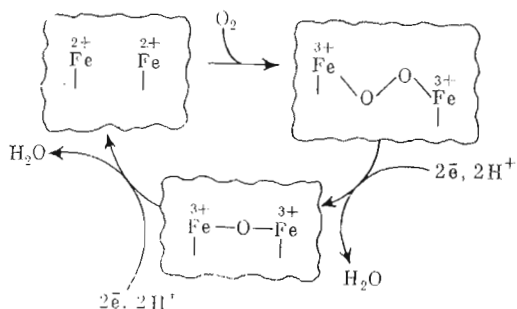
Большой вклад в изучение синтеза порфирина *a* сделан австралийскими учеными. Одна из сложнейших задач — синтез замещенного цитодейтеропорфирина (7з) — была решена посредством циклизации соответствующего билена-*b*. Формильную группу в положении 8 получали окислением винильной, предшественником которой был выбран β-бромэтильный заместитель. Винильная группа в положении 4 образуется при восстановлении ацетильной группы [100]. Для введения в порфириновый цикл гексагидрофарнезилыльного остатка была использована реакция алкилирования магниевого комплекса (8) (схема 3) хлорангидридом порфирина (7з).

В результате был синтезирован насыщенный аналог порфирина *a* (7и) в виде диастереоизомеров [99]. Использование в этой схеме фарнезилмалоната привело к получению порфирина *a*, идентичность которого природному образцу была доказана методами жидкостной хроматографии высокого давления и ПМР со сдвигающими реагентами. Однако и в этом

2.5. Формы цитохромоксидазы

В зависимости от состояния железа и меди цитохромоксидаза может существовать как в окисленной (Fe^{3+} , Cu^{2+}), так и в восстановленной (Fe^{2+} , Cu^+) формах. Третья форма фермента образуется при прямом взаимодействии с кислородом. По-видимому, она представляет собой комплекс типа $\text{Fe} \cdot \text{O}_2$, аналогичный оксигемоглобину, и называется оксигенированной цитохромоксидазой. Стабильность этой формы в очищенном состоянии не исключает возможности, что она является первым продуктом взаимодействия кислорода и фермента. Информация, полученная для простых модельных систем и для цитохромоксидазы, подтверждает следующую цепь превращений полностью восстановленной, оксигенированной и полностью окисленной форм фермента (схема 4) [108].

Схема 4



Переход цитохромоксидазы из восстановленного состояния в окисленное сопровождается конформационными изменениями. Повышенная устойчивость окисленной формы фермента к протеолизу [109] и величины коэффициентов седиментации [110, 111] свидетельствует о более компактной упаковке этой формы молекулы. Изучение спектров КД показывает, что в окисленной форме процент спирализации меньше, чем в восстановленной (39 и 44% соответственно) [112]. В связи с этим возникает вопрос: как конформационные изменения влияют на положение гема *a* в белке?

Изучение взаимодействия цитохромоксидазы с алкилизонитрилами показало, что протетическая группа глубоко спрятана в молекуле [113]. В окисленной форме фермента доступность гема *a* молекулам возмущающих растворителей составляет 23% от доступности полностью открытого протогема гидролизата цитохрома *c*. В случае сложных белков, таких, как гемоглобин и каталаза, гемы доступны молекулам возмущающего растворителя на 10%. Для гемопротеинов с одной белковой цепью (миоглобин, цитохром *c*) эта величина составляет 40% [114]. Использование возмущающих растворителей с различной величиной молекул дает дополнительную информацию о размерах гемовой полости. Оказалось, что к гему могут проникать молекулы размером до 2,3 Å. По-видимому, в окисленном состоянии часть гема *a* выступает наружу из белковой глобулы. При восстановлении цитохромоксидазы происходят значительные структурные изменения и гем *a* становится практически недоступным для действия возмущающих растворителей.

2.6. Цитохромы *a* и *a*₃. Гем-гемное взаимодействие

Два гема, входящие в состав цитохромоксидазы, ведут себя различно по отношению к кислороду и ингибиторам. Впервые предположение о том, что фермент состоит из двух компонентов, было высказано Кейлпным и

Хартри и основывалось на спектроскопических исследованиях [102]. Одна часть цитохромоксидазы реагировала с окисью углерода и цианидами и была названа цитохромом a_3 . Другая, не реагирующая с этими ингибиторами, была названа цитохромом a .

Изучение различных форм цитохромоксидазы позволило сделать вывод о присутствии в ней эквимолекулярных количеств цитохромов a и a_3 . Все попытки разделить эти компоненты, сохранив их природную активность, были безуспешны. Тем не менее функциональные различия между цитохромами a и a_3 не вызывают сомнения [6, 8].

Показано, что гемы цитохромов a и a_3 находятся на небольшом расстоянии друг от друга [115, 116], что делает возможным взаимодействие между ними. Гем-гемное взаимодействие доказано с помощью электронных спектров [117—122], ЭПР [123, 124], а также определением потенциалов полувосстановления [118, 120]. Изучение электронных спектров показало, что в отсутствие дополнительных лигандов, например окиси углерода, вклады обоих цитохромов одинаковы. При добавлении лиганда к цитохромоксидазе вклад цитохромов a и a_3 становится различным, причем разность зависит от структуры добавленного лиганда и определяется взаимодействием гемов.

Согласно иной точке зрения [125], основанной на изучении цитохромоксидазы методом магнитного КД, между гемами не существует взаимодействия, которое приводит к изменению электронных спектров.

Измерение потенциалов полувосстановления цитохрома a позволяет сделать вывод о взаимодействии протетических групп в цитохромоксидазе. Найдено, что при связывании лиганда гемом цитохрома a_3 происходит изменение потенциала полувосстановления цитохрома a , которое в среднем составляет 80 мВ при значении 210 мВ для цитохромоксидазы без дополнительных лигандов [118, 120].

Считают, что гем-гемное взаимодействие проявляется в спектрах ЭПР окисленного фермента. Сигнал высокоспинового ферригема с g 6 при этом отсутствует, и наблюдается сигнал низкоспинового ферригема с g 3. Добавление восстановителя к анаэробной суспензии митохондриальных частиц [126] приводит к восстановлению цитохрома a_3 и появлению высокоспинового сигнала ферригема (g 6). Следовательно, восстановление одного гема позволяет проявиться сигналу другого гема, находящегося еще в окисленном состоянии.

Наиболее ясно взаимодействие гемов в цитохромоксидазе видно по изменению спектра ЭПР при добавлении окиси углерода к ферменту, у которого цитохром a_3 восстановлен, а цитохром a окислен. Окись углерода присоединяется к восстановленному цитохрому a_3 . При этом сигнал высокоспиновой формы окисленного цитохрома a с g 6 исчезает и появляется сигнал низкоспинового феррицитохрома a с g 3 [124, 126]. Этот эффект наблюдается как для изолированной цитохромоксидазы, так и для фермента, находящегося в митохондриях. Такое превращение спиновых форм происходит практически на 100% и объясняется, по мнению авторов, только гем-гемным взаимодействием. Следует отметить, что все приведенные доказательства существования связи протетических групп фермента носят качественный характер. Количественные оценки этого взаимодействия только начали появляться. Показано, что присоединения окиси углерода к восстановленному цитохрому a_3 приводит к изменению энергии конформационного состояния окисленного цитохрома a по крайней мере на 2,7 ккал/моль [127].

Таким образом, к настоящему времени достаточно удовлетворительно разрешены две основные проблемы, связанные со строением цитохромоксидазы. Существование гем-гемного взаимодействия не вызывает сомнений, как и то, что фермент состоит из двух функциональных единиц — цитохромов a и a_3 , в которых две протетические группы идентичной структуры находятся в разном белковом окружении.

Полная структура цитохромоксидазы еще неизвестна, и предстоит большая работа по изучению расположения белковых субъединиц, гемов *a*, атомов меди в молекуле фермента и факторов, связывающих эти компоненты в систему, обладающую биологической активностью.

3. МЕХАНИЗМ ДЕЙСТВИЯ ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Обеспечение живых организмов энергией тесно связано с процессом внутриклеточного дыхания. Энергия, получаемая в результате преобразования компонентов пищи, освобождается главным образом при переносе электронов к кислороду в дыхательной цепи. Последнюю стадию этого процесса — непосредственное взаимодействие с кислородом — катализирует цитохромоксидаза.

Сложность процесса переноса электронов требует его пространственной организации. Дыхательная цепь, как действующая ферментная система, тесно связана с белково-липидными структурными элементами мембран митохондрий [7]. На участках дыхательной цепи с наибольшими перепадами окислительно-восстановительных потенциалов происходит образование АТФ. Этот процесс, получивший название «окислительное фосфорилирование», является основным источником энергии для всех организмов, не способных к фотосинтезу.

По мнению большинства исследователей, наиболее вероятным механизмом окислительного фосфорилирования является процесс, в основу которого положена гипотеза Митчелла [128] о разделении зарядов в митохондриях. В результате действия дыхательной цепи у внешней поверхности мембраны происходит накопление протонов, а у внутренней образуется их недостаток и возникает определенная разность потенциалов. Движущей силой процесса фосфорилирования является электрохимический градиент ионов водорода. Сопряжение фосфорилирования и клеточного дыхания осуществляется через мембранный потенциал [129].

Завершающие стадии переноса электронов в дыхательной цепи обеспечиваются цитохромом *c* и цитохромоксидазой, включающей цитохромы *a* и *a₃*. Изучение комплекса цитохром *c* — цитохромоксидаза [130] с помощью бифункциональных реагентов показало, что цитохром *c* связывается со второй субъединицей цитохромоксидазы ($M \sim 24\,000$) [131]. При изучении торможения дыхания с помощью полилизина было показано, что по крайней мере часть цитохрома *a₃* лежит на мембране с противоположной стороны по отношению к цитохрому *c* [132]. О расположении цитохромоксидазы в мембране свидетельствуют данные, полученные при исследовании сплин-меченого фермента методом ЭПР [133] и при изучении реакционной способности отдельных субъединиц фермента [134].

Исследование встраивания цитохромоксидазы в искусственные мембраны с помощью электронной микроскопии показало, что фермент расположен поперек мембраны и активен только в таком положении [135].

Существуют две точки зрения относительно механизма действия цитохромоксидазы. Согласно первой, белки фермента закреплены в мембране таким образом, что конформационные изменения, вращение и другие перемещения невозможны и электронный перенос от цитохрома *a* к цитохрому *a₃* осуществляется посредством полупроводникового механизма. По второму варианту, электронный перенос в цитохромоксидазе включает конформационные изменения, что необходимо для взаимодействия гемов-цитохромов *c*, *a* и *a₃* [136]. Имеются прямые указания на то, что переход фермента из окисленного состояния в восстановленное сопровождается конформационными изменениями [109, 110, 113, 114; 127, 137]. Показана возможность вращения цитохрома *a₃* в мембране [138, 139].

В работе [134] приводятся возможные механизмы действия цитохромоксидазы, в основу которых положены предположения о конформа-

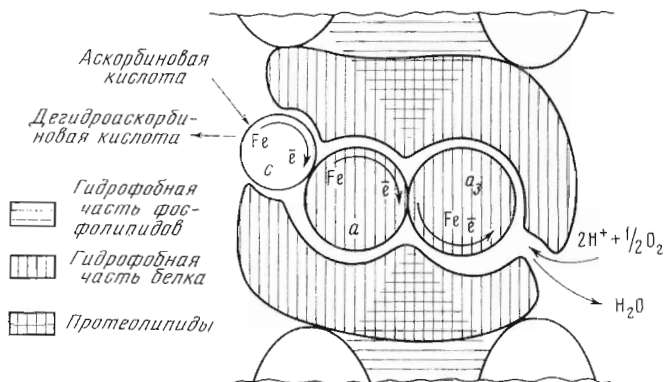


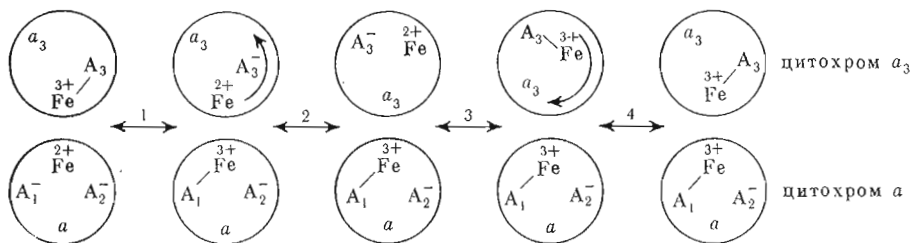
Рис. 1. Модель расположения цитохромоксидазы в мембране [136]

ционных изменениях. На рис. 1 приведено вероятное расположение цитохромоксидазы в мембране [136].

Согласно этой модели, гемсодержащая субъединица представляет собой гидрофобный глобулярный белок, и ее поворот в специальной структурно-организованной полости может происходить без значительных изменений в электрическом сопротивлении мембраны.

Как развитие этой мысли, на схеме 5 [136] показаны некоторые детали переноса электронов от восстановленного гема a , который находится в центре мембраны, к кислороду, подходящему к цитохрому a_3 с внутренней стороны мембраны.

Схема 5

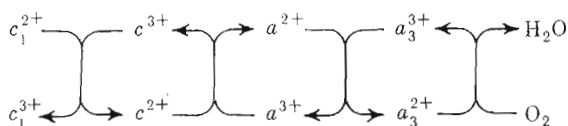


Постулируется, что восстановление гема цитохрома a_3 гемом цитохрома a (стадия 1) приводит к образованию отрицательно заряженной группы A_3^- в белке цитохрома a_3 , расположенной вблизи от другого аниона A_2^- , принадлежащего цитохрому a . В этом случае электронный перенос должен сопровождаться образованием электрического поля в области A_2^- и A_3^- , а энергия окислительно-восстановительного процесса переходит в потенциальную энергию поля. Стадия 2 представляет собой вращение цитохрома a_3 . При этом A_3^- удаляется от A_2^- на расстояние, приблизительно равное половине толщины мембраны. На этой стадии энергия локального электрического поля превращается в энергию мембранного потенциала. Реакция завершается переносом электрона от цитохрома a_3 к кислороду (стадия 3) и возвращением цитохрома a_3 в исходное состояние (стадия 4), причем группа A_3 движется в нейтральной форме.

Образовавшийся мембранный потенциал может быть использован АТФазой для синтеза АТФ.

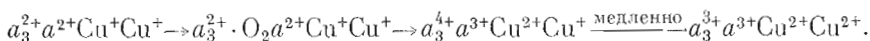
Следует отметить, что механизм действия цитохромоксидазы, приведенный на рис. 1 и схеме 5 [4], является развитием представлений Кейлина,

Хартри, Чанса о взаимодействии цитохромов, которое можно изобразить следующим образом:



Подобная трактовка конечного участка дыхательной цепи подтверждается большим количеством экспериментальных данных. В то же время она имеет и слабые стороны. Так, в рамках этой теории совершенно не обсуждается взаимодействие кислорода с цитохромом a_3 и не принимается во внимание существование оксигенированной цитохромоксидазы, образующейся при прямом взаимодействии ферроцитохромоксидазы с кислородом, а также игнорируется возможная роль меди, валентность которой изменяется в процессе действия фермента.

В связи с необходимостью учитывать все эти факторы появилось несколько теорий. Суммировав их, Лемберг [4] предложил следующий вариант. Ферроцитохромоксидаза может быть представлена как $a_3^{2+}a^{2+}\text{Cu}^+\text{Cu}^+$; феррицитохромоксидаза $a_3^{3+}a^{3+}\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^{2+}$ и оксигенированная $a_3^{4+}a^{3+}\text{Cu}^{2+}\text{Cu}^+$. Взаимодействие фермента с кислородом описывает следующее уравнение:



Предполагается, что цитохромоксидаза переносит 4 электрона и 4 протона на одну молекулу кислорода [6, 7]. Гемы и атомы меди осуществляют этот процесс, вероятно, без привлечения других доноров. Однако нет необходимости в передаче электронов на кислород прямо с железа. Электрон или водородный атом могут, и это весьма вероятно, передаваться кислороду от лиганда [140]. Связывается ли кислород с железом или медью, или же одновременно с двумя металлами, пока не установлено. Однако после присоединения он не покидает активного центра фермента, пока не превратится в воду. Возможно, молекула кислорода присоединяется к металлу с одной стороны, получает четыре электрона и превращается в воду, а металл затем взаимодействует с тремя восстанавливающими группами и возвращается в исходное состояние. Возможными вариантами такого взаимодействия могут быть существование мостиковых лигандов и π -связывание (например, медь образует одну или две π -связи с гемом) [141]. Альтернативным вариантом может быть взаимодействие кислорода с двумя цитохромами сразу. При этом может образовываться пероксидный мостик между атомами железа гемов. Существование оксигенированной цитохромоксидазы свидетельствует в пользу этой точки зрения [141].

Если кислород присоединяется сначала к реакционному центру, не включающему железо гема, то такой процесс может происходить либо с участием атомов меди, либо, аналогично связыванию ксенона гемоглобином и миоглобином, без участия гема. В обоих случаях следующим шагом, вероятно, является образование соединения с пероксидным мостиком $\text{Fe}-\text{O}-\text{O}-\text{Fe}$, которое превращается в окисленную цитохромоксидазу ($\text{Fe}-\text{O}-\text{Fe}$) и воду с выделением двух электронов. Цитохром c может принимать участие в таком восстановлении, передавая электроны через атомы меди или через мостиковые лиганды [140].

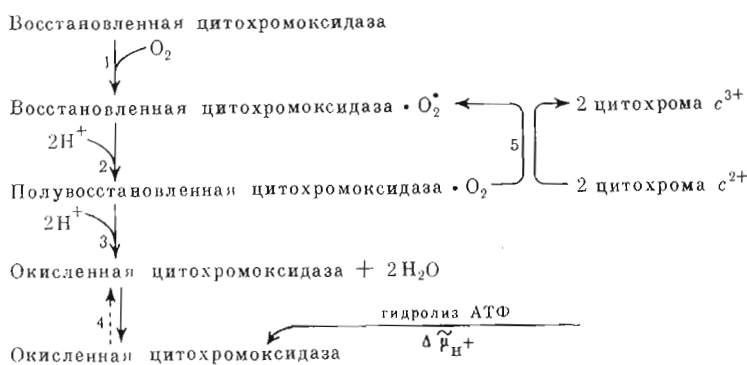
Изучение взаимодействия цитохрома c и цитохромоксидазы показало, что электроны поступают через цитохром a и затем быстро переносятся к другому реакционному центру, в состав которого, вероятно, входит медь [142].

Недавно появились сообщения [143] о существовании «протонного насоса», связанного с цитохромоксидазой или входящего в состав фермента

в качестве одной из субъединиц. Перенос протонов через мембрану, вероятно, связан с конформационными изменениями цитохромов a и a_3 , а также со спиновым состоянием атомов железа гемов a . Наблюдаемые явления свидетельствуют о том, что перенос двух электронов к $1/2 O_2$ сопровождается разделением четырех зарядов, а не двух, как постулирует хемиосмотическая теория [144].

Предложено несколько вариантов механизма действия цитохромоксидазы, отражающих современное состояние знаний о ферменте. Один из них представлен на схеме 6 [8].

С х е м а 6

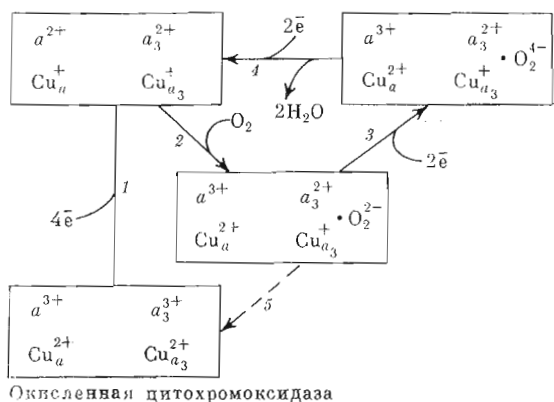


Исследования, проведенные при низких температурах, позволили идентифицировать последовательность реакций цитохромоксидазы с кислородом. Был сделан вывод, что цикл реакций включает полностью восстановленную форму (a^{2+} , a_3^{2+}), оксиформу (a^{2+} , $a_3^{2+} \cdot O_2$) и полувосстановленную пероксиформу без участия полностью окисленного фермента (a^{3+} , a_3^{2+}). Пероксиформа представляет собой равновесную смесь соединений a^{2+} , $a_3^{3+} \cdot O_2^{2-}$ и a^{3+} , $a_3^{2+} \cdot O_2^{2-}$.

В митохондриальных мембранах, богатых энергией, окисленная форма цитохромоксидазы стабилизируется в результате конформационных изменений и выключается из цикла реакций с кислородом, что позволяет осуществлять контроль над процессом клеточного дыхания [8].

На схеме 7 представлен иной механизм действия фермента [142].

С х е м а 7



В этом варианте форме цитохромоксидазы, образующейся при присоединении кислорода к восстановленному ферменту, трудно приписать ка-

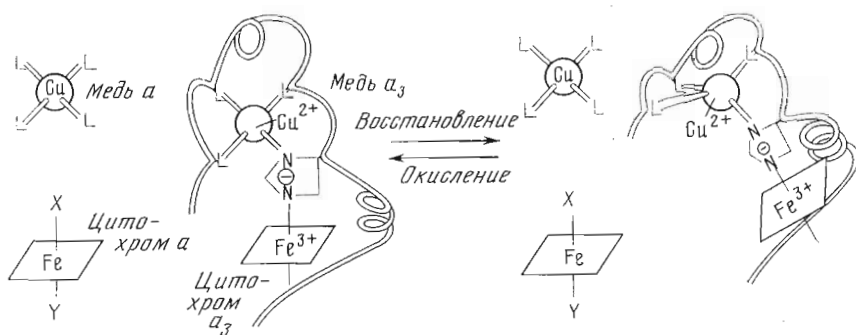
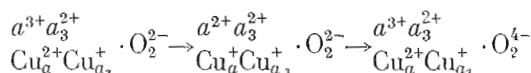


Рис. 2. Модель активного центра цитохромоксидазы [145]. L – лиганд

кую-либо структуру, хотя авторы отдают предпочтение пероксиформе. Стадия 3 может быть представлена следующим образом:



В этом механизме также предусмотрена система регулирования клеточного дыхания, основанная на интенсивности потока электронов по дыхательной цепи. Каталитический цикл (схема 7, стадии 2–4) будет сохраняться при достаточно большом потоке электронов через систему. При его уменьшении цитохромоксидаза в виде окисленной формы будет выходить из каталитического цикла (схема 7, стадия 5). Обратный переход в активную восстановленную форму происходит при росте потока электронов через дыхательную цепь [142].

На основании данных магнитного кругового дихроизма и ЭПР в работе [145] предложена модель цитохромоксидазы. Согласно этой модели, фермент содержит один низкоспиновый ферригемопротейн (цитохром a), один магнитноизолированный атом меди (Cu_a) и антиферромагнитносвязанный димер, состоящий из атома меди (Cu_{a_3}) и высокоспинового гемопротейда (цитохром a_3).

На рис. 2 показаны изменения, происходящие при одноэлектронном восстановлении антиферромагнитносвязанной меди.

Гем цитохрома a_3 остается высокоспиновым, а цитохрома a – низкоспиновым как в восстановленной, так и в окисленной форме цитохромоксидазы. Природа аксиальных лигандов X и Y цитохрома a не определена, но они должны обладать достаточной силой, чтобы удерживать гем в низкоспиновом состоянии. Атом меди, вероятно, взаимодействует с атомами серы. Предполагаемое антиферромагнитное связывание между цитохромом a_3 и Cu_{a_3} позволяет объяснить известные свойства фермента. Важная роль в этом механизме отводится конформационным изменениям. Так, при окислении меди a_3 шестая координация гема a_3 становится вакантной, что обеспечивает высокоспиновое состояние. В то же время для достижения известной инертности цитохрома a_3 по отношению к типичным гемовым лигандам часть полипептидной цепи должна изменить конформацию и занять вакантную координацию. При восстановлении также происходят конформационные изменения белковой цепи, что в свою очередь приводит к деблокированию шестой координации атома железа цитохрома a_3 . Этот процесс может происходить при восстановлении либо цитохрома a , либо меди a_3 .

Моделирование активного центра цитохромоксидазы представляет собой определенный шаг в изучении механизма действия фермента и позволяет провести эксперименты, подтверждающие или отвергающие предложенную концепцию.

Рассмотренный материал показывает современный уровень знаний о строении и механизме действия цитохромоксидазы. Очевидно, в ближайшее время следует ожидать установления аминокислотной последовательности всех субъединиц фермента, их пространственной структуры, положения гемов и ионов меди. Это в свою очередь позволит поставить новые вопросы по изучению функционирования данного фермента.

В период подготовки обзора к печати появился ряд работ по изучению строения и механизма действия цитохромоксидазы. Предложен новый метод получения больших количеств фермента из бычьих сердец, основанный на применении хроматографии на октил-сефарозе CL-4B [146]. Продолжается интенсивное изучение субъединичного состава цитохромоксидазы [147—151] и расположения субъединиц в мембране [152—154]. С этой целью нашли применение методы иммунной химии [155, 156]. Установлению аминокислотной последовательности отдельных субъединиц посвящены работы [157—159].

Изучение взаимодействия цитохромоксидазы и цитохрома *c* [160—165] позволило установить место связывания фермента с молекулой цитохрома *c*. Убедительно показано, что цитохром *c* взаимодействует со второй субъединицей цитохромоксидазы [154, 161, 165].

Для выяснения механизма действия цитохромоксидазы продолжается изучение расположения и взаимодействия гемов *a* и атомов меди [166—170]. Предложены модели для изучения активного центра фермента [171, 172]. На основании изучения окисгенированных производных фермента предложена схема взаимодействия цитохромоксидазы с кислородом [173].

Активно продолжается исследование роли цитохромоксидазы в транспорте электронов и протонов через мембрану [174—180].

ЛИТЕРАТУРА

1. Keilin D. (1966) The history of cell respiration and cytochromes, Cambridge University Press.
2. Okumuki K. (1966) in: Comprehensive Biochemistry. Biological Oxidation, pp. 232—241, Elsevier, Amsterdam.
3. Caughey W. S. (1967) Ann. Rev. Biochem., 36, 611—644.
4. Lemberg R. (1969) Physiol. Rev., 49, 48—121.
5. Laskowska-Klita T. (1973) Postepy Biochemii, 19, 261—278.
6. Malmström B. G. (1974) Quart. Rev. Biophys., 6, 389—431.
7. Warton D. C. (1973) in: Inorganic Biochemistry (Eichore G. L., ed.), vol. 2, pp. 955—987. Elsevier, Amsterdam.
8. Wikström M. K. F., Harmon H. J., Ingledow W. J., Chance B. (1976) FEBS Lett., 65, 259—277.
9. Nichols P., Chance B. (1974) in: Molecular Mechanisms of Oxygen Activation (Hayashi O., ed.), pp. 479—534, Acad. Press, N. Y.
10. Caughey W. S., Wallace W. J., Volpe J. A., Yoshikawa S. (1976) in: The Enzymes (Boyer P. D., ed.), vol. 13, pp. 299—337.
11. Haematin Enzymes (1961) Falk J. E., Lemberg R., Morton R. K., eds, Pergamon Press, London.
12. Oxidases and Related Redox Systems (1965) King T. E., Mason H. S., Morrison M., eds, Wiley, N. Y.
13. Hemes and Hemoproteins (1966) Chance B., Estabrook R. W., Yonetani T., eds, Acad. Press, N. Y.
14. Structure and Function of Cytochromes (1968) Okumuki K., Kamen M. D., Sekuzu J., eds, University of Tokyo Press, Tokyo.
15. The Mechanism of Energy Transduction in Biological Systems (1974) Ann. N. Y. Acad. Sci., 227.
16. The Biological Role of Porphyrins and Related Structures (1975) Ann. N. Y. Acad. Sci., 244.
17. Okumuki K. (1967) Comprehensive Biochemistry, 14, 232—308.
18. Kuboyama M., Young F. C., King T. E. (1972) J. Biol. Chem., 247, 6375—6383.
19. Orii Y., Okumuki K. (1965) J. Biochem. (Tokyo), 58, 561—568.
20. Yonetani T. (1961) J. Biol. Chem., 236, 1680—1688.
21. Yonetani T. (1967) Methods in Enzymology, vol. 10 (Estabrook P. W., ed.), pp. 332—335, Acad. Press, N. Y.
22. Capaldi R. A., Hayashi H. (1972) FEBS Lett., 26, 261—263.

23. Mason T. L., Poyton R. O., Warton D. C., Schatz G. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 1346-1354.
24. Volpe J. A., Caughey W. S. (1964) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **61**, 452-459.
25. Yu C., Yu L., King T. E. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 1383-1392.
26. Shakespear P. G., Mahler H. R. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 7649-7655.
27. Keyhani J., Keyhani E. (1975) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **167**, 588-595.
28. Birchmeier W. (1977) *Mol. Cell. Biochem.*, **14**, 1-3, 81-86.
29. Tzagoloff A., MacLennan D. H. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **99**, 476-485.
30. Morrison M., Bright J., Rouser G. (1966) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **114**, 50-55.
31. Robinson N. C., Capaldi R. A. (1977) *Biochemistry*, **16**, 375-381.
32. Chien T. F., Mueller P. (1976) *Fed. Proc.*, **35**, 1599.
33. Takemori S., Sekuzu J., Okunuki K. (1961) *Biochim. et biophys. acta*, **51**, 464-472.
34. Tzagoloff A., Yang P. C., Warton D. C., Rieske J. S. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **96**, 1-8.
35. Love B., Chan S., Stotz E. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 6664-6669.
36. Wainio W. W., Laskowska-Klita T., Rosman J., Grebner D. (1973) *J. Bioenerg.*, **4**, 455-467.
37. Gerd S., Buse G. (1976) *Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **357**, 1125-1137.
38. Phan S. H., Mahler H. R. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 257-269.
39. Shakespear P. G., Mahler H. R. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 7649-7655.
40. Weiss H., Sebald W., Bucher T. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **22**, 19-26.
41. Weiss H., Lorenz B., Kleinow B. (1972) *FEBS Lett.*, **25**, 49.
42. Rubin M. S., Tzagoloff A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4269-4274.
43. Shatz G., Masson G. S. P., Rouslin W., Warton W. S., Soltzgeber J. (1972) *Fed. Proc.*, **31**, 21-29.
44. Sebald W., Machleidt W., Otto J. (1973) *Eur. J. Biochem.*, **38**, 311-324.
45. Poyton R. O., Schatz G. (1965) *J. Biol. Chem.*, **250**, 752-766.
46. Briggs M., Kamp P. F., Robinson N. C., Capaldi R. A. (1975) *Biochemistry*, **14**, 5123-5128.
47. Downer N. W., Robinson N. S., Capaldi R. A. (1976) *Biochemistry*, **15**, 2930-2936.
48. Walker J. H., Mayer R. J. (1976) *Biochem. Soc. T.*, **4**, 342-344.
49. Werner S. (1977) *Eur. J. Biochem.*, **79**, 103-110.
50. Yu. C. A., Yu L. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **495**, 248-259.
51. Capaldi R. A., Bell R. L., Brancheck T. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **74**, 425-433.
52. Weber K., Osborn M. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 4406, 4412.
53. Swanck R. T., Munkers K. D. (1971) *Anal. Biochem.*, **39**, 462-477.
54. Fairbanks G., Steck T. L., Wallach D. F. H. (1971) *Biochemistry*, **10**, 2606-2617.
55. Yamamoto T., Orii Y. (1974) *J. Biochem. (Tokyo)*, **75**, 1081-1089.
56. Kornblatt J. A., Barraff G., Williams G. R. (1973) *Can. J. Biochem.*, **51**, 1417-1427.
57. Rubin M. S., Tzagoloff A. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 4275-4279.
58. Hundt E., Kadenbach B. (1977) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **358**, 1309-1314.
59. Phan S. H., Mahler H. R. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 270-276.
60. Komai H., Capaldi R. A. (1973) *FEBS Lett.*, **30**, 273-276.
61. Tzagoloff A., Akai A., Rubin M. S. (1973) in: *Biogenesis of Mitochondria* (Kroon A. M., Saccone C., eds), pp. 405-421, Acad. Press, N. Y.
62. Orii Y., Yoshida S., Liruka T. (1976) in: *Iron and Copper Proteins* (Yasunobu K. T., Mower H. F., Hayaishi O., eds), pp. 228-239, Plenum Press, N. Y.
63. Gutteridge S., Winter D. B., Bruyninckx W. Y., Mason H. S. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **78**, 945-951.
64. Yu. C. A., Yu L., King T. E. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **74**, 670-676.
65. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **76**, 1014-1019.
66. Briggs M. M., Capaldi R. A. (1977) *Biochemistry*, **16**, 73-78.
67. Eytan G. D., Carrol R. C., Shatz G., Racker E. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 8598-8603.
68. Matsubara H., Orii Y., Okunuki K. (1965) *Biochim. et biophys. acta*, **97**, 61-67.
69. Orii Y. (1975) *Seikagaku*, **47**, 303-322.
70. Shmunkler H. W. (1963) *Naval Air Development Center, Johnsville, Pa.*, 18 pp., AD 424 100.
71. Wainio W. W., Nikodem V. (1973) *J. Bioenerg.*, **4**, 579-590.
72. Tsudzuki T., Orii Y., Okunuki K. (1967) *J. Biochem. (Tokyo)*, **62**, 37-45.
73. Tanaka M., Haniu M., Yasunobu K. T., Yu. C. A., Yu L., King T. E. (1976) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **66**, 357-367.
74. *Porphyryns and Metalloporphyrins* (1975) Smith K. M., ed., Elsevier, Amsterdam.
75. Fischer H., Orth H. (1937) *Die Chemie des Pyrroles*, Bd. 2, S. 173-183, Leipzig.
76. Lemberg R. (1966) in: *Hemes and Hemoproteins* (Chance B., Estabrook K. W., Yonetani T., eds), Acad. Press, N. Y.
77. Clezy P. S., Barrett J. (1961) *Biochem. J.*, **78**, 798-806.
78. Marks G. S., Dougall D. K., Bullock B., McDonald S. F. (1960) *J. Amer. Chem. Soc.*, **82**, 3183-3188.

79. Marks G. S., Dougall D. K., Bullock B., McDonald S. F. (1959) *J. Amer. Chem. Soc.*, **81**, 250.
80. Lemberg R. (1953) *Nature*, **172**, 649-621.
81. Piatelli M. (1960) *Tetrahedron*, **8**, 226-230.
82. Clezy P. S., Barrett J. (1959) *Biochim. et biophys. acta*, **33**, 584-589.
83. Grasll M., Augsburg G., Coy V., Lynen F. (1963) *Biochem. Z.*, **337**, 35-47.
84. Grasll M., Coy V., Seyfert R., Lynen F. (1963) *Biochem. Z.*, **338**, 771-795.
85. Seyfert R., Grasll M., Lynen F. (1966) in: *Hemes and Hemoproteins* (Chance B., Estabrook K. W., Yonetani T., eds), pp. 45-52, Acad. Press, N. Y.
86. Lemberg R. (1966) in: *Hemes and Hemoproteins* (Chance B., Estabrook K. W., Yonetani T., eds), pp. 25-59, Acad. Press, N. Y.
87. Caughey W. S. (1965) in: *Oxidases and Related Redox Systems* (King T. E., Mason H. S., Morrison M., eds), vol. 1, pp. 110-113, Wiley, N. Y.
88. York J. L., McCoy S., Taylor D. N., Caughey W. S. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 908-911.
89. Smythe G. A., Caughey W. S. (1970) *J. Chem. Soc., D*, 809-811.
90. Caughey W. S., Smythe G. A., O'Kneffe D. H., Maskasky J. E., Smith M. L. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7602-7622.
91. DeFillippi L. J., Hultquist D. E. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **498**, 395-402.
92. Евстигнеева Р. П., Миронов А. Ф., Флейдерман Л. И. (1973) *Докл. АН СССР*, **210**, 1090-1093.
93. Миронов А. Ф., Флейдерман Л. И., Евстигнеева Р. П. (1974) *Ж. общ. химии*, **44**, 1165-1171.
94. Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 789-794.
95. Жестков В. П., Миронов А. Ф., Устынюк Л. А., Евстигнеева Р. П. (1975) *Биоорганическая химия*, **1**, 1673-1674.
96. Жестков В. П., Миронов А. Ф., Розынов Б. В., Устынюк Л. А., Мягкова Г. И., Евстигнеева Р. П. (1976) *Биоорганическая химия*, **2**, 1231-1236.
97. Кулиш М. А., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. (1976) *Тр. МИТХТ*, **6**, 71-75.
98. Кулиш М. А., Кожич Д. Т., Миронов А. Ф., Евстигнеева Р. П. (1978) *Биоорганическая химия*, **4**, 1237-1243.
99. Clezy P. S., Fookes C. J. R. (1977) *Austr. J. Chem.*, **30**, 1799-1813.
100. Clezy P. S., Diakiv V. (1975) *Austr. J. Chem.*, **28**, 2703-2725.
101. Thompson M., Barrett J., McDonald E., Battersby A. R., Fookes C. J. R., Chandhry J. A., Clezy P. S., Morris H. R. (1977) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 278-279.
102. Keilin D., Hartree E. F. (1939) *Proc. Roy. Soc. London, ser. B*, **127**, 167-191.
103. Beinert H., Palmer G. (1965) in: *Oxidases and Related Redox Systems* (King T. E., Mason H. S., Morrison M., eds), p. 567, Wiley, N. Y.
104. Meson H., Ganapathy K. (1970) *J. Biol. Chem.*, **245**, 230-237.
105. Yong F. C., King T. E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 6384-6388.
106. Seiter C. H. A., Angelos S. G., Perreault R. A. (1977) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **78**, 761-765.
107. Tzagoloff A., MacLennan D. (1966) in: *The Biochemistry of Copper* (Peisach J., Aisen P., Blumberg W. E., eds), pp. 233-265, Acad. Press, N. Y.
108. Caughey W. S., Barlow C. H., Maxwell J. C., Volpe J. A., Wallace W. J. (1975) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **244**, 1-9.
109. Yamamoto T., Okunuki K. (1972) *J. Biochem. (Tokyo)*, **71**, 435.
110. Cabral F., Love B. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **283**, 181-186.
111. Kornblatt J. A., Kells D. J. C., Williams G. R. (1975) *Can. J. Biochem.*, **53**, 461-466.
112. Myer J. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 1241-1248.
113. Yamamoto T., Orii Y. (1973) *J. Biochem. (Tokyo)*, **73**, 1049-1059.
114. Cabral F., Love B. (1974) *Biochemistry*, **13**, 2038-2043.
115. Myer J. P., King T. E. (1969) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **34**, 170-175.
116. Urry D., Wainio W., Grebner D. (1967) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **27**, 625-631.
117. Leigh J. S., Wilson D. F., Owen C. S., King T. E. (1974) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **160**, 476-486.
118. Wilson D. F., Dutton P. L. (1970) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **39**, 59-64.
119. Wilson D. F., Lindsay J. G., Brokkehurst E. S. (1972) *Biochim. et biophys. acta*, **256**, 277-286.
120. Lindsay J. G., Wilson D. F. (1972) *Biochemistry*, **11**, 4613-4621.
121. Dutton P. L. (1971) *Biochim. et biophys. acta*, **226**, 63-80.
122. Wilson D. F., Dutton P. L. (1971) *Archs. Biochem. and Biophys.*, **136**, 583-586.
123. Wilson D. F., Dutton P. L., Erecinska M., Lindsay J. O., Sato N. (1972) *Account. Chem. Res.*, **5**, 234-241.
124. Leight J. S., Wilson D. F. (1972) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **48**, 1266-1272.
125. Babcock G. T., Vickery L. E., Palmer G. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 7907-7919.
126. Wilson D. F., Leight J. S. (1972) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **150**, 154-163.
127. Wilson D. F., Leight J. S. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **227**, 630-635.

128. Mitchell P. (1964) *Nature*, **191**, 144–146.
129. Скулачев В. П. (1972) Трансформация энергии в биомембранах, «Наука», М.
130. Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 1104–1115.
131. Brigs M. M., Capaldi R. A. (1978) *Biochem. and Biophys. Res. Commun.*, **80**, 553–559.
132. Schneider D. L., Kadawa Y., Racker E. (1972) *J. Biol. Chem.*, **247**, 4074–4079.
133. Kornblatt J. A., Chen W. L., Hsia J. C., Williams G. R. (1975) *Can. J. Chem.*, **53**, 364–370.
134. Eytan G. D., Schatz G. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 767–774.
135. Ruben G. C., Telford J. N., Carrol R. C. (1976) *J. Cell. Biol.*, **68**, 724–739.
136. Skulachev V. P. (1974) *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **227**, 188–201.
137. Wakabayashi T., Senior A. S., Natese O., Hyashi H., Green D. E. (1972) *J. Bioenerg.*, **3**, 339–344.
138. Yunge W. (1972) *FEBS Lett.*, **25**, 109–112.
139. Kurze U., Junge W. (1977) *FEBS Lett.*, **80**, 429–434.
140. Caughey W. S., Davies J. L., Fuchsman W. H., McCoy S. (1968) in: *Structure and Function of Cytochromes* (Okunuki K., Kamen M. D., Sekuzu J., eds), pp. 20–33, University of Tokyo Press, Tokyo.
141. Caughey W. S., Alben J. O., Besuderan C. A. (1965) in: *Oxidases and Related Redox Systems* (King T. E., Mason H. S., Morrison M., eds), vol. 1, pp. 97–105, Wiley, N. Y.
142. Antonini E., Brunori M., Colosino A., Greenwood C., Willson M. T. (1977) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 3128–3132.
143. Wikstrom M. K. F. (1978) *Nature*, **266**, 271–273.
144. Brand M. D., Reynafarje B., Lehninger A. L. (1976) *J. Biol. Chem.*, **251**, 5670–5679.
145. Palmer G., Babcock G. T., Vickery L. E. (1976) *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **73**, 2206–2210.
146. Rosen S. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **523**, 314–320.
147. Orii Y., Masao M., Mashiko Y. (1977) *J. Biochem.*, **81**, 505–517.
148. Maeshima M., Asahi T. (1978) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **187**, 423–430.
149. Höchli L., Hackenbrook C. R. (1978) *Biochemistry*, **17**, 3712–3719.
150. Poyton R. O., McKemie E., Nasimento C. G. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 6303–6306.
151. Tracy R. P., Chan S. H. P. (1979) *Biochim. et biophys. acta*, **576**, 109–117.
152. Dockter M. E., Steinemann A., Schatz G. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 311–317.
153. Frey T. G., Chan S. H. P., Schatz G. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 4389–4395.
154. Bisson R., Gutweniger H., Azzi A. (1978) *FEBS Lett.*, **92**, 219–222.
155. Chan S. H. P., Thielmann H. W. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **89**, 595–606.
156. Werner S., Machleidt W. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **90**, 99–105.
157. Buse G., Steffence G. J. (1978) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1005–1009.
158. Buse G., Steffence G. J., Steffence G. C. M. (1978) *Hoppe Seyler's Z. Physiol. Chem.*, **359**, 1011–1013.
159. Cabral F., Solioz M., Rudin Y., Schatz C., Clavilier L., Slonimski P. P. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 297–304.
160. Ferguson-Miller S., Brautigan D. L., Margoliash E. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 149–159.
161. Bisson R., Gutweniger H., Montecucco C., Colonna R., Zanotti A., Azzi A. (1977) *FEBS Lett.*, **81**, 147–150.
162. Rieder R., Bosshard H. (1978) *FEBS Lett.*, **92**, 223–226.
163. Smith H. T., Staudenmayer N., Millett F. (1977) *Biochemistry*, **16**, 4971–4974.
164. Petersen L. Chr. (1978) *FEBS Lett.*, **94**, 105–109.
165. Bisson R., Azzi A., Gutweniger H., Colonna R., Montecucco C., Zanotti A. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 1874–1880.
166. Blasie J. K., Erecinska M., Samuels S., Leigh J. S. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **501**, 53–62.
167. Tweedle M. F., Wilson L. J., Iniguez L. G., Babcock G. T., Palmer G. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8065–8071.
168. Moss T. H., Shapiro E., King T. E., Beinert H., Hartzell C. (1978) *J. Biol. Chem.*, **253**, 8072–8073.
169. Van Camp H. L., Wei J. H., Scholes C. P., King T. E. (1978) *Biochem. et biophys. acta*, **537**, 238–246.
170. Stevens T. H., Bocian D. F., Chan S. J. (1979) *FEBS Lett.*, **97**, 314–316.
171. Petty R. H., Wilson L. T. (1978) *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 483–485.
172. Babcock G. T., Chang C. K. (1979) *FEBS Lett.*, **97**, 358–362.
173. Chans B., Caronio C., Waring A., Leigh J. S. (1978) *Biochim. et biophys. acta*, **503**, 37–55.
174. Erecinska M., Wilson D. F. (1978) *Arch. Biochem. and Biophys.*, **188**, 1–14.
175. Wikström M. K. F., Saari H. T. (1977) *Biochim. et biophys. acta*, **462**, 347–361.
176. Moyle J., Mitchell P. (1978) *FEBS Lett.*, **88**, 268–272.
177. Wikström M., Krab K. (1978) *FEBS Lett.*, **91**, 8–14.
178. Sigel F., Carafoli E. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **89**, 119–125.

179. Арцатапов В. Ю., Константинов А. А., Скулачев В. П. (1977) Докл. АН СССР, **237**, 461-464.
180. Константинов А. А. (1977) Докл. АН СССР, **237**, 713-716.

Поступила в редакцию
17.VII.1978

CYTOCHROME OXIDASE: STRUCTURE AND MECHANISM OF ACTION

KULISH M. A., MIRONOV A. F.

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

In the review, recent data on the cytochrome oxidase subunit structure and amino acid composition, as well as on the structure of prosthetic group and the implication of various enzyme constituents in the mechanism of action are discussed.
