

УДК 577.151.43

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗЫ ТРИТОНОМ X-100

© 2021 И.П. Олейников^{1,2}, Н.В. Ацаркина^{2*}, Т.В. Выгодина², А.А. Константинов²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: azarkina@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.09.2020

После доработки 30.10.2020

Принята к публикации 30.10.2020

Известно, что тритон X-100 (ТХ) обратимо ингибирует активность цитохром *c*-оксидазы (ЦО). В работе проанализирован механизм ингибирования. Действие ТХ не направлено на реакцию ЦО с цитохромом *c*, не вызывает переход фермента в «медленную» форму и не связано с мономеризацией препарата. ТХ полностью подавляет кислород-редуктазную реакцию, однако ингибирование предотвращается и частично обращается додецилмальтозидом (ДМ) – детергентом, применяемым для поддержания ЦО в растворе. Показано, что ДМ конкурирует с ТХ за связывание с ЦО в соотношении 1/1, $K_i = 0,3$ мМ, сродство ДМ к ферменту составляет 1,2 мМ. В окисленном ферменте ТХ вызывает спектральный ответ с максимумом при 421 нм и $[ТХ]_{1/2} = 0,28$ мМ, связанный, предположительно, с гемом a_3 . При взаимодействии ЦО с избытком H_2O_2 ТХ влияет на равновесие кислородных интермедиатов каталитического центра, ускоряя переход $F_{11-607} \rightarrow F_{11-580}$, ингибирует образование ферментом O_2^- и, в меньшей степени, подавляет каталазную парциальную активность. Наблюдаемые эффекты могут объясняться ингибированием превращения в каталитическом цикле интермедиата F_{11-580} в свободную окисленную форму. В работающем ферменте ТХ подавляет внутримолекулярный перенос электронов между гемами a и a_3 . В условиях эффективного ингибирования оксидазной реакции пероксидазная парциальная активность ЦО достаточно устойчива к ТХ. Эти особенности указывают на нарушение проводимости протонного канала К. Мы полагаем, что ТХ взаимодействует с ЦО в центре связывания желчных кислот (ЦСЖК), расположенном на субъединице I в устье К-канала и контактирующем с амфипатическими регуляторами ЦО [Vuhrow et al. (2013) *Biochemistry*, **52**, 6995-7006]. По-видимому, ТХ является аналогом физиологического лиганда ЦСЖК, а молекула ДМ – аналогом эндогенного фосфолипиды, связывающегося на границе ЦСЖК и контролирующего эффективное сродство к лиганду.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *c*-оксидаза, тритон X-100, регуляция, К-канал, амфипатические лиганды.

DOI: 10.31857/S032097252101005X

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *c*-оксидаза (ЦО) катализирует восстановление кислорода до воды электронами, приходящими по дыхательной цепи от субстратов цикла Кребса, открывая возможность использования энергии восстановления кислорода для энергетических нужд клетки в процессе окислительного фосфорилирования. В ходе оксидазной реакции электроны поступают на ЦО от цитохрома *c* и переносятся к месту восстанов-

ления кислорода по цепочке редокс-центров, входящих в структуру фермента (схема 1).

цитохром *c* \Rightarrow Cu_A \Rightarrow гем *a* \Rightarrow гем a_3/Cu_B \Rightarrow O_2

Схема 1. Последовательность переноса электронов по цепочке редокс-центров ЦО.

Кислород восстанавливается в биядерном центре, который образован высокоспиновым гемом a_3 и ионом меди Cu_B . В реакции $O_2 \rightarrow H_2O$ участвуют 4 «субстратных» протона, поступающих в биядерный центр из матрикса митохондрий (цитоплазмы бактерий). С восстановлением кислорода сопряжен также перенос четырех «помповых» протонов через мембрану (в направлении изнутри наружу). Все протоны, участвующие в каталитическом цикле ЦО, переносятся внутри белка по протонным каналам К

Принятые сокращения: ДМ – додецилмальтозид; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; ТХ – тритон X-100; ЦО – цитохром *c*-оксидаза; ЦСЖК – центр связывания желчных кислот; K_i – константа ингибирования; $K_{i(app)}$ – кажущаяся константа ингибирования; Ох – свободная окисленная форма фермента; WST-1 – водорастворимый тетразолий.

* Адресат для корреспонденции.

и D, названным по образующим их критическим аминокислотным остаткам. Более подробно с механизмом работы ЦО можно ознакомиться в недавно вышедших обзорах [1–4].

Как и другие мембранные белки, ЦО отличается высокой гидрофобностью. Первой стадией в процедуре ее выделения является солюбилизация: растворение окружающей мембраны при помощи детергентов и встраивание белка в образованные детергентом мицеллы. В солюбилизированной форме ЦО проходит дальнейшие стадии выделения и очистки, хранится и используется в экспериментах.

Уже при первых попытках выделения ЦО было замечено, что от типа применяемого детергента зависит не только выход препарата, но и его свойства [5, 6]. Так, многие детергенты, называемые «жесткими» (третон, SDS и в меньшей степени холат и дезоксихолат) позволяют экстрагировать ЦО из мембраны наиболее полно и получать стабильный и гомогенный конечный продукт, но обладающий крайне низкой ферментативной активностью. Более «мягкие» агенты (Tween, октилглюкозид, додецилмальтозид), напротив, при меньшем количественном выходе позволяют получить активный препарат [7, 8]. Важным обстоятельством оказался обратимый характер инактивации в первом случае: препарат ЦО, выделенный с применением третона X-100 (ТХ) или желчных кислот, частично или полностью реактивируется при последующей замене детергента на Tween, Emasol, или алкилглюкозиды [7, 9]. В связи с этим «жесткие» детергенты продолжают применять для солюбилизации мембран, но заменяют их на «мягкие», чтобы поддерживать в растворимой форме конечный препарат.

Феномен ингибирования активности митохондриальной ЦО третонем X-100 обсуждался в литературе многократно [5, 7, 10–15]. В ранних работах снижение оксидазной активности в присутствии ТХ обычно связывали с вытеснением детергентом молекул фосфолипидов, прочно ассоциированных с белком в нативных условиях [16]. Отмечалось также, что обработка препарата ТХ ведет к мономеризации белковых комплексов [9, 17, 18], тогда как в составе мембраны (естественной или искусственной), а также в растворе «мягких» неионных детергентов ЦО из митохондрий быка находится в форме димеров [16, 19]. Позже были получены данные о том, что фермент, перешедший в неактивную конформацию, в присутствии ТХ теряет способность к реактивации после прохождения каталитического цикла [14, 15].

В последние годы основное внимание исследователей ЦО сосредоточилось на физиологи-

ческой регуляции фермента, позволяющей быстро и гибко подстраивать его активность под текущие энергетические запросы клетки. Недавно в трехмерной структуре ЦО была выявлена особая гидрофобная площадка, названная центром связывания желчных кислот (ЦСЖК) [20]. Предполагается, что в ЦСЖК могут обратимо связываться амфипатические (содержащие гидрофобные и гидрофильные участки) лиганды — регуляторы активности. В работе Antalík et al. [21] высказывается предположение, что в этой же зоне связывается и ТХ.

В представленной работе мы исследовали взаимодействие ТХ с митохондриальной ЦО более подробно, чем это делалось раньше. Нами обнаружена конкуренция ТХ с «мягким» детергентом додецилмальтозидом (ДМ). Также мы установили место действия ТХ в цепочке переноса электронов по редокс-центрам ЦО и вероятную мишень ингибирования в каталитическом цикле оксидазной реакции. Полученные данные указывают на то, что эффекты ТХ в отношении ЦО имитируют действие природного регулятора ее активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы высокой степени чистоты: pH-буферы (Tris и Hepes) и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) («Amresco», США); β -D-додецилмальтозид квалификации «Sol-grade» («Anatrace», США); *o*-дианизидин дихлорид («ICN Biomedicals Inc», США); L-аскорбиновая кислота, цитохром *c* из сердца лошади (тип III), дитионит натрия, цианид калия, феррицианид калия, ферроцианид калия, тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), каталаза (23000 ед/мг белка), супероксиддисмутаза, третон X-100, гексаммиакат рутения (RuAm) («Sigma-Aldrich», США); водорастворимый тетразолий (water soluble tetrazolium, WST-1) («Dojindo Molecular Technologies», Япония).

Концентрированный раствор перекиси водорода (~30%) («Sigma-Aldrich», США) хранили при +4 °С, перед опытом проверяли концентрацию спектрофотометрически, используя $\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [22], и готовили разведения нужной концентрации. Все растворы готовили на воде, очищенной с помощью системы MilliQ.

Препараты. Цитохром *c*-оксидаза была выделена из митохондрий сердца быка. Говяжьи сердца получали на скотобойне ООО «Пушкинский мясной двор», Пушкино, Московская обл., и хранили во льду до начала процедуры выделения. Выделение начинали через 2–3 ч после за-

боя и проводили по модифицированному методу Fowler et al. [23], как описано ранее [24]. Выделенный препарат хранили расфасованным небольшими порциями при $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$. Концентрацию фермента определяли по разностному спектру оптического поглощения (образец, восстановленный дитионитом, минус окисленный), используя $\Delta\varepsilon_{605-630} = 27\text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$.

Спектрофотометрические измерения проводили в стандартной кювете («Hellma», Германия) с затемненными боковыми гранями и длиной оптического пути 10 мм. Абсолютные спектры поглощения записывали при ширине оптической щели 2 нм и скорости записи 2 нм/с на двулучевом спектрофотометре Cary Bio 300 («Varian», США). Кинетику изменений оптического поглощения регистрировали на спектрофотометре SLM-Aminco DW-2000 («SLM Instruments», США) в двухволновом режиме.

Измерения ферментативных активностей. Оксидазная активность. Скорость потребления кислорода регистрировали амперометрически с помощью закрытого электрода Кларковского типа на приборе Oxugraph («Hansatech», Великобритания) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ и постоянном перемешивании. Измерения проводили в базовой среде, содержащей 50 mM Tris/Нерес, 0,1 mM ЭДТА, при pH 7,5. Перед опытом в базовую среду добавляли детергент (додецилмальтозид или тритон X-100) в указанной концентрации. Концентрация обоих детергентов приводится в тексте в mM (0,05% додецилмальтозид $\approx 1,0\text{ mM}$; 0,1% тритон X-100 $\approx 1,6\text{ mM}$). В качестве субстрата дыхания использовали 5 mM аскорбат (как восстановитель цитохрома *c*), 0,1 mM ТМФД (как редокс-медиатор) и 10 мкМ цитохром *c* (как непосредственный донор). Концентрация ЦО в пробе составляла 15–54 нМ. Скорость дыхания при расчетах корректировали, вычитая самоокисление аскорбата.

Пероксидазную активность ЦО измеряли, как описано ранее [25]. Перекисное окисление 0,2 mM *o*-дианизидина в присутствии перекиси водорода регистрировали спектрофотометрически в двухволновом режиме по разности поглощений при 432 нм относительно волны сравнения 580 нм. В среду опыта (базовая среда + 50 mM KCl, pH 7,5, детергенты в указанных концентрациях) вносили ЦО и *o*-дианизидин. Окисления *o*-дианизидина не наблюдалось и реакцию запускали добавлением H_2O_2 .

Образование супероксида ЦО в присутствии избытка перекиси измеряли на спектрофотометре, классическим методом [26] – по чувствительному к супероксиддисмутазе восстановлению солей тетразолия, которое катализируется

ЦО в присутствии миллимолярных концентраций H_2O_2 . Восстановление водорастворимого красителя WST-1 регистрировали по возрастанию экстинкции при 440 нм относительно волны сравнения 550 нм. Среда опыта: базовая среда + 50 mM KCl, pH 7,5, 1 mM ДМ.

Каталазную активность ЦО регистрировали с помощью кислородного электрода, как описано ранее [27]. Измерения проводили в 30 mM калий-фосфатном буфере, pH 7,2, содержащем 0,1 mM ЭДТА и 1 mM додецилмальтозид («каталазная среда»). В качестве субстрата использовали 12 mM H_2O_2 . Наблюдаемое выделение кислорода полностью подавлялось цианидом.

Перевод ЦО в форму F_I-607 по Николсу. Аэробный раствор фермента в течение 2 мин продували окисью углерода. Как впервые показано в работе Nicholls и Chanady [28], эта процедура позволяет получить оксоферрильный комплекс F_I-607 с высоким выходом и практически без примеси F_{II}-580. Процесс протекает непосредственно в биядерном центре и состоит в его двухэлектронном восстановлении молекулами CO с последующим двухэлектронным окислением кислородом и образованием *in situ* стехиометрического количества H_2O_2 и интермедиата F_I-607. Процедуру проводили в закрытой кювете, в присутствии 0,1 mM феррицианида (для предотвращения восстановления гема *a*) и каталазы, добавляемой в объеме 1 мкл до концентрации 690 ед/мл (для полного удаления возможных следов экзогенной перекиси).

Обработку данных проводили при помощи программы Origin 7 и 9 Microcal (<https://www.originlab.com/>).

Погрешность измерений. Эксперименты по исследованию кинетики изменений концентрации кислорода и изменений оптического поглощения проводили в трех независимых повторах, разброс данных не превышает 10%. В экспериментах по титрованию ферментативных активностей тритоном X-100, реактивации ингибированного фермента додецилмальтозидом, титрованию тритоном спектральных изменений и определению концентрационной зависимости константы скорости каждое измерение проводили в 2–4 независимых повторах, на рисунках приводятся средние значения, оценка погрешности соответствует разбросу экспериментальных точек относительно проведенных теоретических кривых. В эксперименте по титрованию оксидазной активности додецилмальтозидом каждое измерение проводили в 3–10 независимых повторах, на рисунке приводятся средние значения и среднеквадратичные отклонения. В случае спектров поглощения погрешность определяется отношением сигнала к шуму. В экс-

периментах по титрованию спектральных изменений перекисью водорода погрешность соответствует размеру символов на рисунке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТХ ингибирует цитохромоксидазную активность, конкурируя с ДМ за связывание с ЦО. Ингибирование активности в присутствии ТХ. Наши исследования показали, что тритон X-100 подавляет оксидазную активность ЦО в детергентном растворе, что соответствует литературным данным [7, 11, 13, 21]. Ингибирование наблюдается при использовании в качестве субстрата окисления как естественного (цитохром *c*, см. ниже), так и искусственного (ТМФД, данные не приведены) донора электронов. В обоих случаях ингибирование может достигать 100% и предотвращается, а также обращается при повышении в среде концентрации ДМ.

На рис. 1 показано ингибирующее действие ТХ на оксидазную реакцию, катализируемую солюбилизированной формой ЦО из сердца быка. Ингибирование существенно ослабляется при повышении в среде концентрации ДМ. Скорость убыли кислорода в аэробном растворе, содержащем фермент и дыхательный субстрат (цитохром *c*, аскорбат и ТМФД) на фоне 1 мМ ДМ, уменьшается примерно на треть после внесения 1 мМ ТХ (рис. 1, *a*, кривая 1). И наоборот, добавление 1 мМ ДМ к ферменту, работающему с пониженной скоростью в присутствии 1 мМ ТХ, приводит к ускорению оксидазной реакции примерно в 2,5 раза (рис. 1, *a*, кривая 2). Как видно из приведенных данных, ингибирующий эффект ТХ развивается за время смешивания, тогда как после добавления ДМ скорость выходит на стационарный уровень в течение 10–20 с.

Более детально влияние ДМ на ингибирующее действие ТХ показано на рис. 1, *b*, на котором приведены зависимости активности ЦО от концентрации ТХ в присутствии разных концентраций ДМ. Во всех случаях экспериментальные данные хорошо описываются гиперболической функцией, стремящейся к нулю (ингибирование 100%) при бесконечно большой концентрации ингибитора. При этом видно, что повышение в среде [ДМ] приводит к сдвигу действующих концентраций ТХ в сторону больших величин. Мы аппроксимировали полученные данные уравнением:

$$v = \frac{100}{1 + \frac{[I]}{K_{i(\text{app})}}}, \quad (1)$$

где v – нормализованная скорость реакции (в процентах), $[I]$ – концентрация ТХ и $K_{i(\text{app})}$ – кажущееся значение константы ингибирования в присутствии заданной концентрации ДМ. При наибольших концентрациях ДМ (рис. 1, *b*, кривые 4 и 5) в области субмиллимолярных концентраций ингибитора можно заметить небольшую лаг-фазу. Мы предполагаем, что она может быть вызвана включением части молекул ТХ в образованные ДМ пустые мицеллы.

На рисунке 1, *b* значения $K_{i(\text{app})}$, полученные в результате аппроксимации экспериментальных данных уравнением (1), представлены как функция от концентрации ДМ. При концентрациях ДМ ниже 20 мМ зависимость имеет линейный характер, что указывает на конкуренцию в соотношении 1/1 между ТХ и ДМ за связывание с ферментом. Тангенс угла наклона прямой к оси X равен отношению сродства к ЦО ингибитора (ТХ) и его конкурента (ДМ), которое составляет 1/4. Экстраполяция к нулевому значению $[ДМ]$ позволяет оценить истинную величину $K_i = 0,3$ мМ. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс в области отрицательных значений, дает оценку константы диссоциации комплекса ДМ с ферментом, $K_c = 1,2$ мМ.

В рамках предположения о конкуренции между ДМ и ТХ за взаимодействие с ЦО можно выразить $K_{i(\text{app})}$ следующим образом:

$$K_{i(\text{app})} = K_i \cdot \left(1 + \frac{[C]}{K_c}\right), \quad (2)$$

где K_i – истинная константа ингибирования, $[C]$ – концентрация ДМ и K_c – константа диссоциации комплекса ЦО с ДМ. Подставив выражение (2) в уравнение (1), получаем теоретическую зависимость, связывающую скорость работы ЦО с концентрациями ТХ и ДМ, а также с величинами их сродства к ферменту:

$$v = \frac{100}{1 + \frac{[I]}{K_i \cdot \left(1 + \frac{[C]}{K_c}\right)}}. \quad (3)$$

Реактивация додецилмальтозидом ЦО, предварительно ингибированной ТХ. На рис. 2, *a* представлены результаты титрования ДМ активности ЦО, предварительно сниженной добавленным ТХ. Видно, что по мере возрастания [ДМ] активность фермента восстанавливается до некоторого конечного уровня, который тем выше, чем меньше в среде ТХ. В диапазоне концентраций 0–7 мМ ДМ через экспериментальные точки проведены теоретические кривые, соответствующие функции (3) (см. выше), в которой значения $[I]$ и $[C]$ заданы условиями

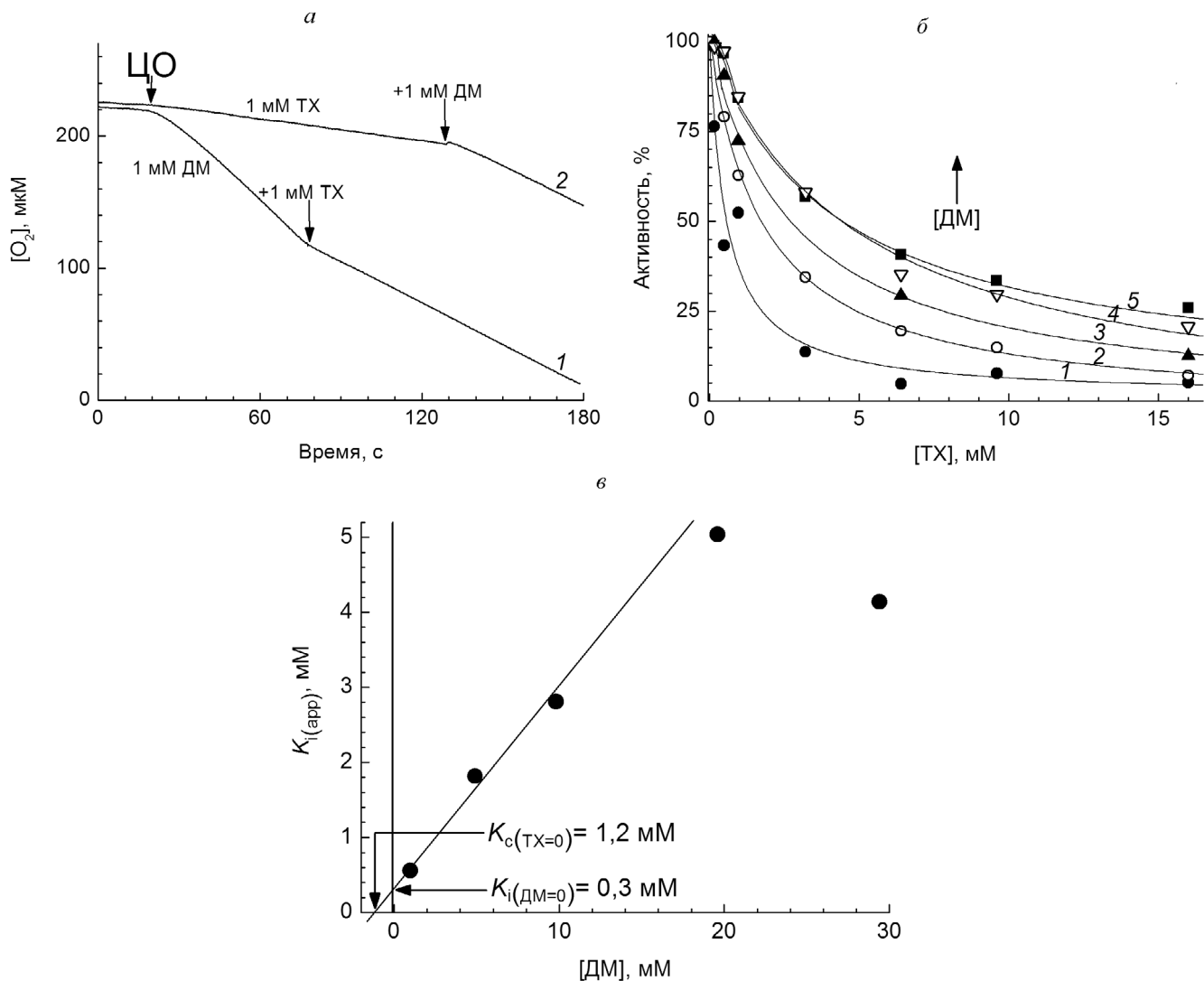


Рис. 1. TX ингибирует оксидазную активность ЦО. *а* – Потребление кислорода в ходе оксидазной реакции. Концентрацию кислорода регистрировали электродом Кларка. В базовую среду добавляли дыхательный субстрат (аскорбат + ТМФД + цитохром *c*) и через 1 мин запускали реакцию внесением ЦО (показано стрелкой). Исходно среда содержала 1 мМ ДМ (кривая 1) либо 1 мМ ТХ (кривая 2). Последующие добавления ТХ и ДМ обозначены стрелками. *б* – Концентрационная зависимость ингибирующего действия ТХ на фоне различных концентраций ДМ. Скорость цитохромоксидазной реакции определяли по убыли кислорода. За 100% принята активность фермента в присутствии 1 мМ ДМ и без ТХ. Среда опыта исходно содержала ДМ в следующих концентрациях: 1 – 1 мМ (черные кружки); 2 – 5 мМ (белые кружки); 3 – 10 мМ (черные треугольники); 4 – 20 мМ (белые треугольники); 5 – 30 мМ (квадраты). Скорость работы фермента в присутствии ТХ определяли через 1 мин после добавления ингибитора. Остальные условия, как на панели *а*. Через экспериментальные точки проведены теоретические кривые, соответствующие уравнению (1) (см. в тексте). Начальные участки кривых 4 и 5 аппроксимированы эмпирически подобранной функцией, описывающей наблюдаемую лаг-фазу (см. в тексте). *в* – Зависимость полученных значений $K_{i(app)}$ от концентрации ДМ. Стрелками показаны отрезки, отсекаемые аппроксимирующей прямой на осях Y и X, которые представляют, соответственно, значение истинной (в отсутствие ДМ) K_i для ТХ и сродство ДМ к ферменту, K_c

опыта, а значения констант K_i и K_c являются подгоночными параметрами, изменяющимися в пределах 0,08–0,23 мМ и 0,2–1,5 мМ соответственно (см. подпись к рис. 2, *а*). Видно, что функция (3) хорошо описывает экспериментальные данные, однако лишь при концентрациях ДМ ниже 10 мМ. Далее, согласно теоретическим кривым, восстановление активности

должно достигать 100% (при бесконечной концентрации ДМ), тогда как в условиях эксперимента активность выходит на конечный уровень, который всегда ниже, чем скорость работы фермента без ТХ. Так, при минимальном добавлении ТХ (0,96 мМ) ингибированной остается ~25% активности (рис. 2, *а*, кривая 1), при максимальном (16 мМ) – ~90%.

На рисунке 2, б показана зависимость активности ЦО от концентрации ДМ в среде опыта. Видно, что при 5 мМ ДМ скорость работы фермента практически не отличается от контрольных условий (1 мМ ДМ). При более высокой концентрации детергента активность достоверно снижается: при 10 мМ ДМ — примерно на 20%, а при 20 мМ ДМ и выше — на 30% от контрольного уровня. Подавление активности ЦО высокими концентрациями ДМ могло бы объяснить отклонение экспериментальных данных в опыте по реактивации фермента от теоретической зависимости (3) (рис. 2, а), а также, возможно, отклонение концентрационной зависимости $K_{i(\text{app})}$ от линейной функции при $[\text{ДМ}] > 20$ мМ (рис. 1, в).

Механизм ингибирующего действия ТХ на ЦО. Для получения информации о механизме взаимодействия ТХ с ферментом мы определили место ингибирования в цепочке переноса электронов, исследовали некоторые изменения, вызываемые ТХ в биядерном центре и сравнили влияние, оказываемое ТХ на катализируемые ЦО парциальные реакции.

ТХ ингибирует перенос электронов с гема а на гем а₃. Последовательность переноса электронов между редокс-центрами ЦО показана на схеме 1. Поскольку ингибирование ТХ обнаруживается при использовании в качестве донора не только цитохрома с, но и ТМФД, оно, очевидно, направлено не на взаимодействие ЦО с внешним донором, а на одну из дальнейших, внутримолекулярных стадий переноса электронов.

Для того, чтобы выяснить, влияет ли ТХ на стационарное распределение электронов между гемом а и биядерным центром в работающем ферменте, ЦО инкубировали в аэробных условиях в присутствии восстановителя (аскорбат + ТМФД), следя за изменениями уровня восстановления гемов по мере протекания реакции. Результаты приведены на рис. 3.

На рис. 3, а представлен опыт, в котором регистрировали изменения поглощения в видимой области (605–630 нм). Это позволяло следить за восстановлением гема а, вклад которого в суммарное поглощение при данных длинах волн составляет 80% [29]. Сравнивая контрольную кривую 1 с кривыми 2–4, можно видеть, что внесение в среду опыта ТХ приводит к увеличению уровня восстановления гема а в стационарных условиях оксидазной реакции. При максимальной концентрации ТХ (16 мМ) уровень восстановления повышается в 3 раза по сравнению с контролем. Кроме того, в присутствии ТХ время протекания реакции до наступления анаэробноза также увеличивается по сравнению с

контролем, что объясняется замедлением работы фермента. Оба эффекта выражены тем сильнее, чем выше концентрация ТХ.

На рис. 3, б представлены результаты аналогичного эксперимента, в котором регистрировалась разность оптического поглощения при

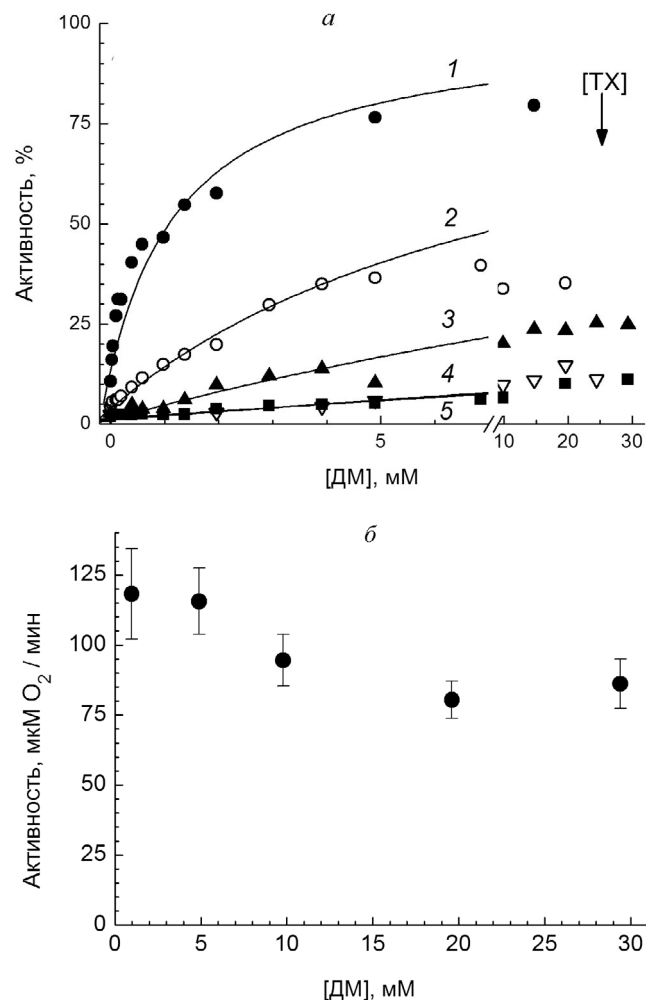


Рис. 2. ДМ восстанавливает активность ЦО, ингибированной ТХ. а — Реактивация ЦО, предварительно ингибированной ТХ, после добавления ДМ. Условия эксперимента как на рис. 1, б, но среда опыта исходно содержала не ДМ, а ТХ в следующих концентрациях: 1 — 0,96 мМ (черные кружки); 2 — 3,2 мМ (белые кружки); 3 — 6,4 мМ (черные треугольники); 4 — 11,2 мМ (белые треугольники); 5 — 16 мМ (квадраты). Скорость работы фермента определяли через 1 мин после добавления ДМ (2 мин после начала дыхания). За 100% принята активность ЦО в среде без ТХ в присутствии 1 мМ ДМ. Данные, представленные на кривых 1–5, аппроксимированы функцией (3) (см. в тексте), в которой параметры K_i и K_c равны, соответственно: 0,15 мМ и 0,2 мМ (кривая 1); 0,13 мМ и 0,32 мМ (кривая 2); 0,08 мМ и 0,33 мМ (кривая 3); 0,12 мМ и 1,0 мМ (кривая 4); 0,23 мМ и 1,5 мМ (кривая 5). б — Зависимость активности ЦО от концентрации ДМ. Скорость работы фермента определяли через 1 мин после начала дыхания в среде с различными концентрациями ДМ. За 100% принята активность ЦО в присутствии 1 мМ ДМ.

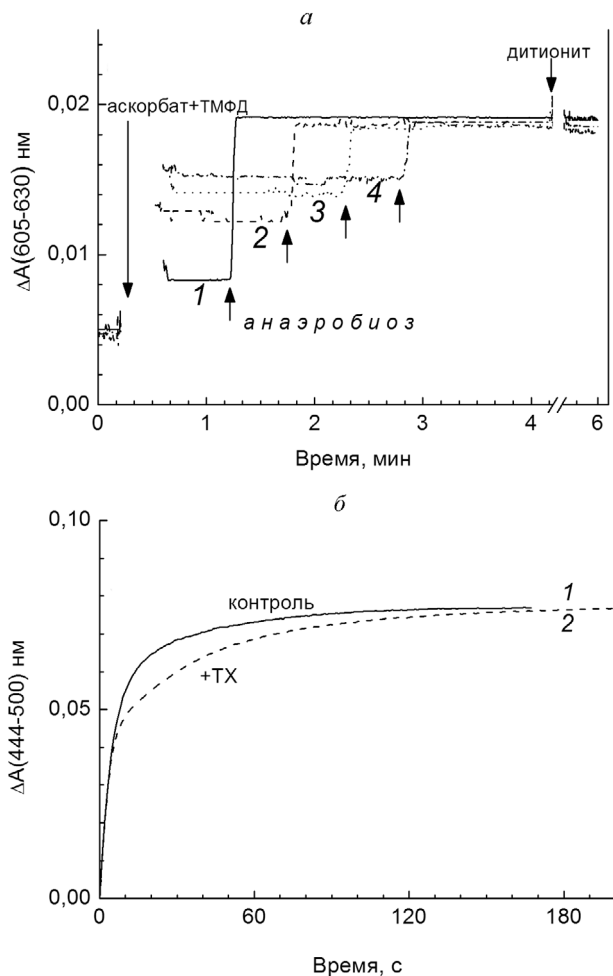


Рис. 3. TX замедляет перенос электрона на гем a_3 . *а* – Влияние TX на стационарный уровень восстановления гема *а* в работающем ферменте. Уровень восстановления регистрировали по разности оптического поглощения при (605–630 нм). Опыт проводили в наполненной до верха закрытой кювете. Оксидазную реакцию запускали добавлением субстрата дыхания (5 мМ аскорбат + 0,1 мМ ТМФД, показано стрелкой) после 30 с записи базовой линии в присутствии аэробной ЦО (0,5 мкМ) в среде опыта (базовая среда + 50 мМ КСl, рН 8,1, 1 мМ ДМ). При этом сигнал выходил на уровень, соответствующий восстановлению в стационарных условиях реакции. После исчерпания в среде кислорода (показано стрелками) происходило полное восстановление ЦО, и сигнал резко возрастал. Отсутствие оптических изменений после добавления дитионита (показано стрелкой) демонстрирует, что в анаэробии достигнуто 100% восстановление гема *а*. Кривая 1 (сплошная линия) – контроль, кривые 2–4 – среда опыта исходно содержала 3,2 мМ (пунктирная линия), 6,4 мМ (линия обозначена точками) и 16 мМ (линия обозначена пунктиром с точками) TX соответственно. *б* – Регистрация суммарного уровня восстановления гемов *а* и a_3 при наступлении анаэробии. Опыт ставили как на панели *а*, но регистрировали разность оптического поглощения в полосе Soret, при 444–500 нм, что позволяло отслеживать уровень суммарного восстановления гемов *а* и a_3 . Представлена завершающая часть кривых, соответствующая восстановлению фермента после наступления анаэробии. Концентрация ЦО – 1,2 мкМ, остальные условия как на панели *а*. Кривая 1 (сплошная линия) – контроль, кривая 2 (пунктир) – среда опыта исходно содержала 6,4 мМ TX

444 нм против 500 нм (γ -полосы восстановленных гемов *а* и a_3 , имеющих в этой области приблизительно равную молярную экстинкцию [29]). Целью данного опыта было исследование кинетики восстановления гемов при наступлении анаэробии (стационарная фаза работы фермента не приводится, для удобства сравнения кривые совмещены по вертикали). Как видно из рисунка, добавление TX существенно замедляет вторую (медленную) фазу суммарного восстановления, которая связана преимущественно с гемом a_3 [21, 30].

Влияние TX на бивалентный центр окисленной ЦО. Спектральный сдвиг. Обнаружилось, что TX влияет не только на активность фермента, но и на его спектр поглощения (рис. 4). При добавлении TX к окисленной форме ЦО возрастает поглощение в районе 420–424 нм (рис. 4, *а*). На разностном спектре относительно окисленного образца появляется максимум с центром при 421 нм (рис. 4, *б*), что указывает на участие в спектральных изменениях гема a_3 . Спектральный ответ развивается быстро (за 3 мин после добавления 0,16 мМ TX) и стабилен в течение нескольких часов. Амплитуда ответа растет с увеличением концентрации TX.

На рисунке 4, *в* показана зависимость амплитуды ответа при 421 нм от концентрации TX. Зависимость имеет вид кривой с насыщением при $[TX] \approx 3$ мМ, коэффициент экстинкции достигает значения $6 \text{ мМ}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$. Данные хорошо аппроксимируются гиперболической функцией. Величина $S_{50\%}$ (концентрация TX, вызывающая полумаксимальный ответ) = 0,28 мМ (сравн. с величиной $K_{i(\text{app})} = 0,56$ мМ, полученной в сходных условиях, см. рис. 1, *б* и *в*).

Связывание цианида. Известно, что препарат ЦО может находиться в «быстрой» и «медленной» формах [31], которые различаются скоростью взаимодействия с лигандами. Соотношение двух форм сильно варьирует в зависимости от методики выделения. Переход фермента в «медленную» форму может провоцироваться многими факторами, в том числе – воздействием детергента. В некоторых работах [14, 15] высказывается предположение, что причиной ингибирования ЦО в присутствии TX может быть переход фермента в неактивную форму. Спектрально «быстрая» и «медленная» формы отличаются друг от друга положением максимума в полосе Soret окисленного фермента (424 нм vs 417 нм соответственно) [31]. Как видно из рис. 4, *а*, в присутствии TX поглощение в области Soret немного сдвигается не в коротко-, а в длинноволновую сторону, однако суммарный пик в обоих случаях гетерогенен, и количественно определить соотношение двух форм в образце

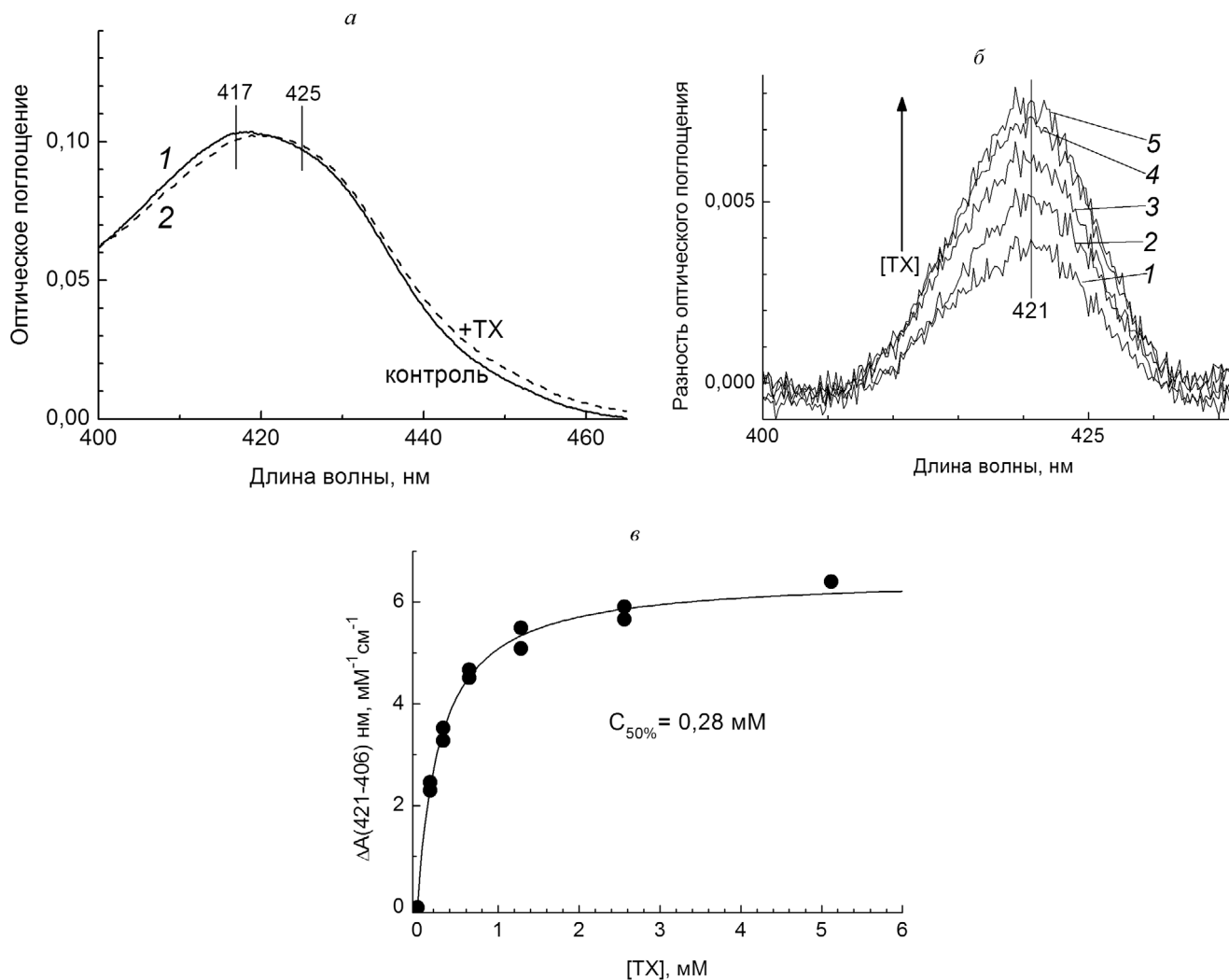


Рис. 4. TX влияет на спектр поглощения гема a_3^{3+} . *a* – Абсолютные спектры поглощения аэробно окисленной ЦО без добавок (1, сплошная линия) и в присутствии 16,8 mM TX (2, пунктирная линия). Базовая среда, pH 7,5, 1 mM ДМ. Концентрация ЦО – 0,5 мкМ. Спектры записаны после 2 мин инкубации фермента в среде опыта. *б* – Разностные спектры поглощения относительно аэробно окисленной ЦО (1,22 мкМ) зарегистрированы через 6 мин после добавления TX. Концентрация TX: 1 – 0,16 mM; 2 – 0,32 mM; 3 – 0,64 mM; 4 – 1,28 mM; 5 – 2,56 mM. Базовая среда, pH 7,0, 1 mM ДМ. *в* – Представлена зависимость амплитуд (421–406 нм) разностных спектров, показанных на панели б, от концентрации добавленного TX

не представляется возможным. Мы решили выяснить, не вызывает ли TX образование «медленной» формы ЦО, изучив его влияние на реакцию фермента с типичным лигандом окисленного биядерного центра, цианидом. Замедление этой реакции считается классическим признаком перехода фермента в «медленную форму».

На рисунке 5 представлены результаты опыта, в котором спектрально (при длинах волн 434–412 нм) регистрировалась кинетика образования комплекса ЦО с цианидом. На рисунке приведена зависимость константы скорости образования комплекса от концентрации цианида. Зависимость имеет двухфазный характер и линейна в обеих фазах. При этом в интервале концентраций KCN 0,2–20 mM значения констант

скорости в контроле и в присутствии TX практически совпадают. Наблюдаемые величины хорошо согласуются с литературными данными [31] и указывают на преобладание в обоих случаях «быстрой» формы.

Влияние TX на парциальные реакции ЦО. Полный каталитический цикл ЦО включает стадии, связанные с превращениями перекиси водорода. Это соединение образуется в биядерном центре в процессе восстановления ферментом кислорода и представляет собой природный лиганд окисленного гема a_3 .

Влияние TX на стационарные концентрации оксоферрильных интермедиатов в псевдокаталитическом цикле. В отличие от реакции с цианидом, взаимодействие перекиси водорода с биядер-

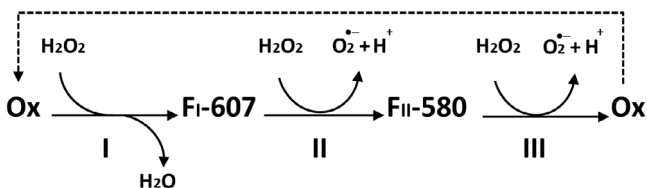


Схема 2. Псевдокатализный цикл ЦО. Показано состояние биядерного центра: Ox — свободный окисленный ($a_3^{3+}/\text{Cu}^{2+}/\text{Tyr244}$), F_I-607 — оксоферрильное состояние I ($a_3^{4+} = \text{O}_2^-/\text{Cu}^{2+}/\text{Tyr244}^*$), F_{II}-580 — оксоферрильное состояние II ($a_3^{4+} = \text{O}_2^-/\text{Cu}^{2+}/\text{Tyr244}$). См. текст.

ным центром ЦО не ограничивается присоединением к окисленному гему a_3 , и образующийся аддукт подвергается дальнейшим превращениям [32, 33]. Эти превращения соответствуют частным стадиям каталитического цикла фермента в так называемой пероксидазной фазе реакции [34, 35]. Последовательность превращений описывается схемой 2, которая получила название «псевдокатализного цикла».

Как можно видеть из схемы 2, в условиях большого избытка H_2O_2 над ферментом возникает многостадийная циклическая реакция, в которой расходуется H_2O_2 и устанавливаются стационарные концентрации интермедиатов F_I-607 и F_{II}-580. Аналогичные кислородные интермедиаты ЦО регистрируются в пероксидазной фазе реакции восстановления кислорода методами быстрой кинетики. Они представляют собой оксоферрильные формы, в которых атом железа гема a_3 находится в высшей степени окисления (+4). В интермедиате F_I-607 на близлежащем остатке Tyr244 имеется электронная вакансия, которая заполняется при поступлении в биядерный центр 3-го электрона, что соответствует превращению F_I-607 → F_{II}-580 [1, 3, 4, 35]. Феррильные формы фермента F_I-607 и F_{II}-580 отличаются от свободной окисленной формы ЦО спектрами поглощения, что позволяет следить за их образованием спектрофотометрически. Друг от друга спектры F_I-607 и F_{II}-580 отличаются в видимой области (максимумы поглощения, соответственно, при 607 и 580 нм на разностном спектре относительно свободного окисленного фермента), а в области Soret практически совпадают.

На рис. 6 показана зависимость стационарной концентрации оксоферрильных интермедиатов ЦО от количества добавленной перекиси водорода и влияние на эту зависимость ТХ. Измерения в области Soret (рис. 6, а) свидетельствуют о том, что при концентрации H_2O_2 20–100 мкМ практически весь фермент переходит в смесь оксоферрильных форм F_I-607 и F_{II}-580. При дальнейшем увеличении концентрации перекиси происходит постепенное исчез-

новение формы F_I-607 (рис. 6, б), которая переходит в форму F_{II}-580, как это следует из сохранения суммарного ответа в области Soret (панель а). Можно видеть, что ТХ не оказывает заметного влияния на переход свободной формы окисленной ЦО в смесь оксоферрильных состояний при добавлении низких микромолярных концентраций перекиси (панель а), но сильно ускоряет исчезновение формы F_I-607 нм при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 (панель б): так, при 20 мкМ H_2O_2 концентрация F_I-607 в опыте и контроле почти одинакова, а при 100 мкМ H_2O_2 она в 3 раза ниже в присутствии ТХ, чем в контроле.

Такое уменьшение стационарной концентрации интермедиата F_I-607 под действием ТХ в псевдокатализном цикле можно было бы объяснить двояко. Во-первых, ТХ мог бы воздействовать непосредственно на оксоферрильный комплекс F_I-607, дестабилизируя его. Во-вторых, к снижению стационарного уровня F_I-607 должно также приводить уменьшение скорости его образования в цикле (реакция I на схеме 2) либо увеличение скорости его распада (реакция II на схеме 2). Для проверки первой возможности мы исследовали влияние ТХ на стабильность формы F_I-607, полученной не в результате

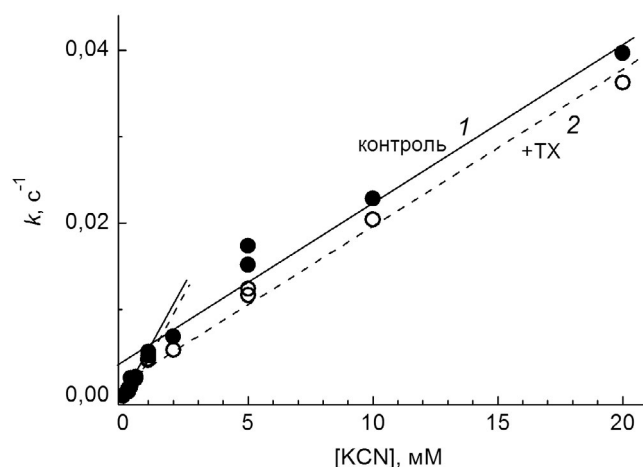


Рис. 5. ТХ не влияет на скорость образования цианидного комплекса окисленной ЦО. Связывание цианида с ферментом регистрировали спектрофотометрически. Концентрация ЦО — 1 мкМ. Среда опыта (базовая среда, pH 8,1, 1 мМ ДМ) содержала 100 мкМ феррицианид калия для предотвращения восстановления ЦО в цианидном комплексе. Реакцию запускали добавлением KCN, после чего ее скорость регистрировали по возрастанию оптического поглощения при 434–412 нм. Приведены рассчитанные константы скорости образования комплекса псевдопервого порядка (k). Через экспериментальные точки, полученные в контрольных условиях (без ТХ, черные кружки) и в присутствии 6,4 мМ ТХ (белые кружки), проведены аппроксимирующие прямые 1 (сплошная линия) и 2 (пунктирная линия) соответственно

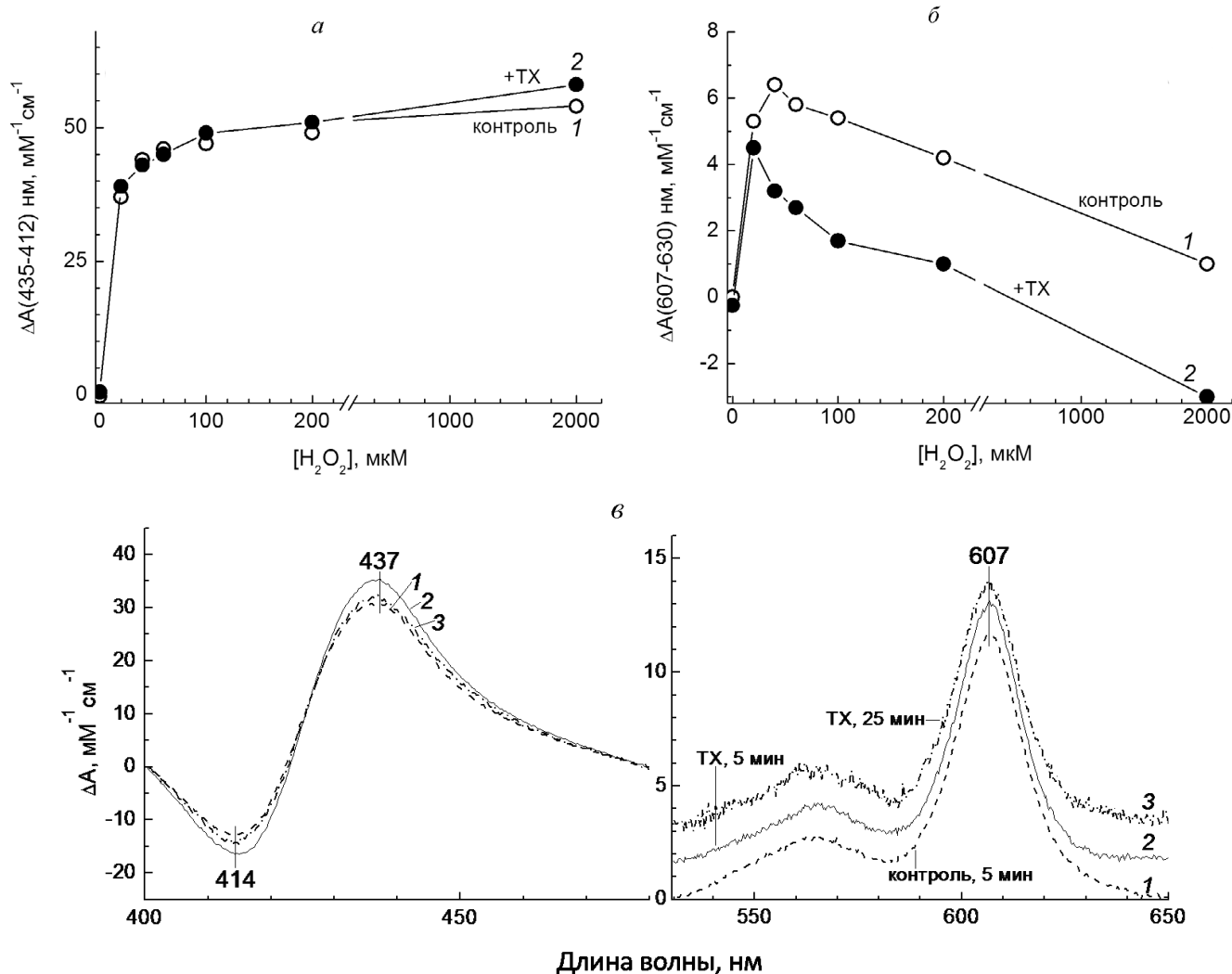


Рис. 6. TX уменьшает стационарную концентрацию интермедиата F_1-607 в псевдокаталазном цикле ЦО. *a* – Полоса Соре, *б* – видимая область. Концентрационная зависимость амплитуды спектральных ответов, возникающих при титровании ЦО (1,3 мкМ) возрастающими концентрациями H_2O_2 . Среда опыта: базовая среда + 50 мМ КСl, рН 8,1, 1 мМ ДМ. Титрование проводили в среде без TX (контроль – кривая 1, белые кружки) либо в присутствии 6,4 мМ TX (кривая 2, черные кружки). Изменение амплитуд возникающих разностных спектров относительно окисленной ЦО регистрировали по разности поглощения при 435–412 нм, панель *a*, либо при 607–630 нм, панель *б*. Добавление H_2O_2 производили с интервалом в 6 мин, спектры записывали через 3 мин после очередного добавления. *в* – TX не влияет на стабильность интермедиата F_1-607 , полученного путем пропускания CO через аэробный раствор ЦО. Показан разностный спектр образца (относительно окисленной ЦО), возникающий после 2 мин обработки CO. Среда опыта: базовая среда + 50 мМ КСl, рН 8,1; 1 мМ ДМ; 0,1 мМ феррицианид; каталаза. Эксперимент проводили в закрытой кювете. Спектр 1 (пунктирная линия) – контроль, спектры 2 (сплошная линия) и 3 (чередование пунктира с точками) – среда опыта содержала 16 мМ TX. Спектры 1 и 2 записаны через 5 мин, а спектр 3 – через 25 мин после обработки CO

взаимодействия ЦО с перекисью водорода, а альтернативным методом, по Николсу (см. «Методы исследования»). Форма ЦО, химически идентичная F_1-607 , образуется при аэробном взаимодействии окисленного фермента с окисью углерода [28]. Как видно из приведенных на рис. 6, *в* разностных спектров (ЦО после обработки CO против окисленного образца), в этом случае TX практически не влияет ни на эффективность образования формы F_1-607 , ни на ее стабильность. Форма F_1-607 в присутствии

16 мМ TX стабильна, по крайней мере, 25 мин (сравн. спектры образца, записанные через 5 и через 25 мин после обработки CO, с контролем – соответственно, 2, 3 и 1). Это время соответствует стандартной продолжительности проведения полных титрований ЦО перекисью водорода, данные которых показаны на рис. 6, *a* и *б*. Таким образом, более вероятно, что действие TX на стационарную концентрацию интермедиата F_1-607 в ходе титрования ЦО перекисью водорода объясняется изменением

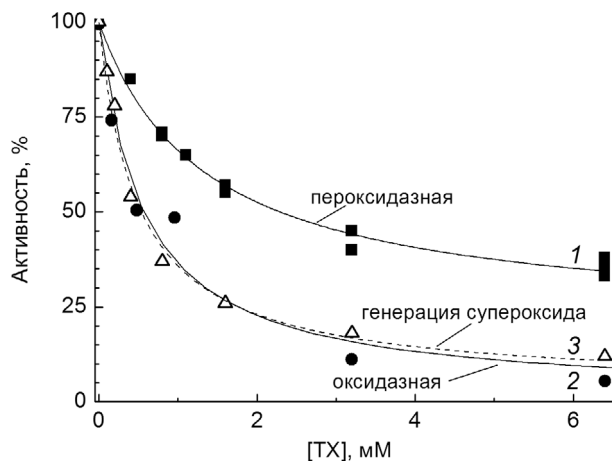


Рис. 7. Сравнение действия ТХ на оксидазную и парциальные активности ЦО. Все измерения проводили при pH 7,5 в присутствии 1 мМ ДМ. Ферментативные активности выражены в % от соответствующего контрольного значения, полученного в отсутствие ТХ. Кривая 1: пероксидазную активность (черные квадраты) определяли спектрофотометрически по перекисному окислению *o*-дианизидина. Условия: ЦО — 0,5 мкМ, *o*-дианизидин — 0,2 мМ, H₂O₂ — 4 мМ. Кривая 2: оксидазную активность (черные кружки) измеряли, как на рис. 1, б. Кривая 3: генерацию супероксида (пунктирная линия, белые треугольники) измеряли спектрофотометрически, по восстановлению красителя WST-1. Условия: ЦО — 1 мкМ, WST-1 — 0,1 мМ, H₂O₂ — 2 мМ

скорости реакции на некоторых стадиях псевдокатализного цикла, представленного на схеме 2.

Действие ТХ на пероксидазную активность. Для того, чтобы определить, какие из стадий, входящих в полный каталитический цикл ЦО, являются мишенью действия ТХ, мы протестировали чувствительность к ингибированию парциальных активностей фермента.

ЦО катализирует двухэлектронное восстановление до воды связанной с окисленным биядерным центром молекулы перекиси, что представляет собой «пероксидазную» часть полного каталитического цикла фермента [34]. Однако регистрировать такую активность не просто, поскольку в аэробных условиях перекись, как конечный акцептор, проигрывает кислороду, и пероксидазная реакция составляет лишь малую долю общего числа оборотов фермента. Для измерения пероксидазной активности ЦО использовались высокопотенциальные доноры: редокс-буфер ферро/феррицианид (с редокс-потенциалом около +400 мВ) вместе с каталитическим количеством цитохрома *c*, служащего непосредственным донором электронов для ЦО, либо классический субстрат пероксидаз — *o*-дианизидин [25, 34]. При редокс-потенциале буфера выше +400 мВ оксидазная активность ЦО практически отсутствует, и реакция включается до-бавлением в качестве конечного акцептора H₂O₂,

что позволяет регистрировать пероксидазную активность ЦО в аэробных условиях [34].

Влияние ТХ на пероксидазную активность ЦО показано на рис. 7, кривая 1. Было обнаружено, что в условиях двукратного ингибирования оксидазной реакции ТХ почти не оказывает действия на пероксидазную активность ЦО (сравн. кривые 2 и 1 на рис. 7). В миллимолярном диапазоне концентраций ТХ пероксидазная реакция проявляет частичную чувствительность к ингибированию: 80% активности титруется с $K_{i(app)} = 1,5$ мМ, что втрое превышает значение $K_{i(app)}$ для оксидазной реакции в тех же условиях (1 мМ ДМ), а 20% активности остается устойчиво к действию ингибитора.

Ингибирование образования O₂^{•-}. Схема псевдокатализного цикла ЦО предсказывает образование супероксидных радикалов при взаимодействии ЦО с H₂O₂ на стадии одноэлектронного восстановления F_I-607, а также, возможно, и при восстановлении интермедиата F_{II}-580 (см. схему 2, стадии II и III). Появление супероксидных радикалов в ходе реакции окисленной ЦО с избытком H₂O₂ было показано нами экспериментально [33, 36] и подтверждено недавно в работе Jancura et al. [37]. Эта реакция может рассматриваться как еще одна парциальная окислительно-восстановительная активность фермента.

Данные по влиянию ТХ на образование супероксидных радикалов при взаимодействии ЦО с избытком H₂O₂ представлены на рис. 7, кривая 3. За образованием радикалов O₂^{•-} следили по восстановлению окрашенных солей тетразолия, которое полностью подавлялось супероксиддисмутазой, цианидом, а также тепловой инактивацией ЦО (данные не приведены). Было найдено, что образование радикалов O₂^{•-} столь же чувствительно к ТХ, как и оксидазная реакция. Как показано на рис. 7, концентрационные зависимости двух активностей (кривые 3 и 2 соответственно) практически совпадают и характеризуются значением $K_{i(app)} \approx 0,5$ мМ.

Влияние ТХ на каталазную активность. Еще одной частной реакцией ЦО является каталазная активность: способность окисленного фермента разлагать перекись водорода с выделением кислорода [6, 38]. Несмотря на активное изучение этого вопроса [27, 37, 39], механизм реакции окончательно не установлен. Известно, однако, что процесс происходит при участии окисленного биядерного центра. Как обсуждается в работах Konstantinov et al. [33, 39], каталазная активность, как и генерация O₂^{•-}, может быть связана с функционированием фермента в режиме псевдокатализного цикла и осуществляться на стадиях II и III (схема 2).

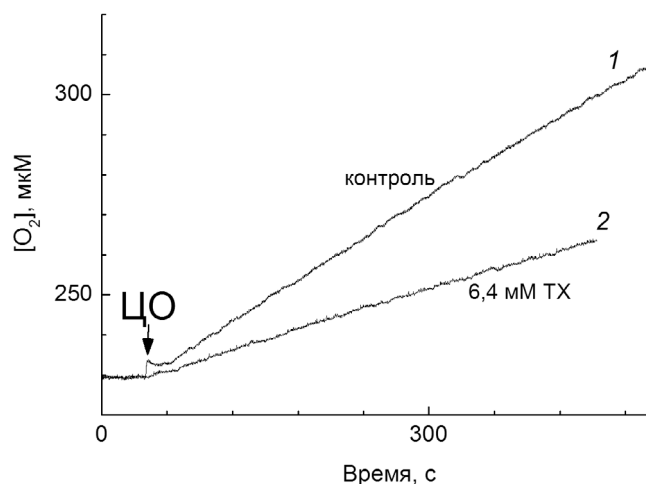


Рис. 8. Влияние ТХ на каталазную активность ЦО. Каталазную активность ЦО регистрировали по выделению кислорода. Среда опыта («каталазная среда», рН 7,2, 1 мМ ДМ) содержала 12 мМ H_2O_2 . Реакцию запускали добавлением 1 мкМ ЦО (показано стрелкой). Кривая 1 – контроль, кривая 2 – среда опыта содержала также 6,4 мМ ТХ

Каталазную активность окисленной ЦО определяли в присутствии H_2O_2 по скорости повышения в среде концентрации O_2 (рис. 8). В контрольном опыте скорость реакции составляет ~10 мкМ O_2 за 1 мин (рис. 8, кривая 1), а в присутствии ТХ она уменьшается до 6 мкМ O_2 за 1 мин (рис. 8, кривая 2). Аналогичные результаты получены при добавлении ТХ по ходу реакции (данные не приведены). Таким образом, 6,4 мМ ТХ ингибирует каталазную активность ЦО на 40%, т.е. примерно вдвое менее эффективно, чем оксидазную (сравн. с ингибированием оксидазной активности в тех же условиях на 91% – см. рис. 1, б, кривая 1 и рис. 7, кривая 2).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью нашего исследования была попытка понять механизм действия тритона на активность солюбилизированной ЦО из митохондрий сердца быка. На основании полученных результатов мы прежде всего смогли отвергнуть несколько перечисленных ниже возможностей.

- Ингибирование оксидазной активности ТХ не направлено на взаимодействие ЦО и цитохрома *c* – это следует из того, что эффект наблюдается при использовании альтернативного дыхательного субстрата, ТМФД (рис. 3). Отметим также, что, по данным работ Rosevear et al. [9], Sinjorgo et al. [13] и Mahapatro и Robinson [14], ТХ не изменяет скорости связывания цитохрома *c* с солюбилизированным ферментом.

- Действие ТХ не связано с переходом ЦО в «медленную» форму. Об этом свидетельствует тот факт, что ТХ не влияет на скорость взаимодействия окисленной ЦО с КСН в широком диапазоне концентраций лиганда (рис. 5). Замедление этой реакции является основным признаком перехода фермента в «медленную» форму. Можно заключить, что ТХ не только не вызывает подобный переход, но вообще не влияет на соотношение двух форм в препарате.

- ТХ используется как агент, вызывающий переход ЦО из димерной формы в мономерную, и можно было бы думать, что наблюдаемые в нашей работе эффекты имеют к этому отношение. Однако методики, применяемые для мономеризации, предполагают условия весьма далекие от использованных в нашей работе. В частности, концентрация ТХ составляет в них от 80 мМ [17] до 800 мМ [18]. Как отмечается в работах Robinson и Capaldi [16] и Sadoski et al. [40], при концентрациях тритона в диапазоне 0,1–1% (соответствует 1,6–16 мМ) фермент полностью остается в димерной форме. Это соответствует условиям всех наших экспериментов.

Мы предполагаем, что исследуемые нами эффекты тритона на ЦО имеют прямое отношение к механизмам регуляции фермента. В серии работ лаборатории Ferguson-Miller [20, 41–44] в трехмерной структуре ЦО из *Rhodobacter sphaeroides* описана гидрофобная площадка, способная связывать относительно крупные амфипатические молекулы. Сравнительный анализ структуры ЦО из сердца быка обнаруживает аналогичный участок и у фермента из митохондрий [42, 45]. Сайт получения названия центра связывания желчных кислот, поскольку на некоторых структурах в нем видна связанная молекула детергента, использовавшегося при кристаллизации: дезоксихолат в ЦО из *R. sphaeroides* и холат в ЦО из сердца быка. Согласно результатам компьютерного анализа структуры, ЦСЖК обладает сродством к целому ряду физиологически активных соединений амфипатической природы (производным желчных пигментов, ретиноевой кислоте, стероидам, тиреоидному гормону, нуклеотидам и др.) [43]. Для некоторых из них было показано модулирующее (ингибирующее или активирующее) влияние на активность ЦО. ЦСЖК находится на границе субъединиц I и II у внутренней стороны мембраны, вблизи входа в протонный канал К. В непосредственной близости от него на структуре ЦО из *R. sphaeroides* просматривается связанная молекула децилмальтозида: ее алкильный «хвост» расположен в гидрофобной впадине на границе субъединиц I и II, а мальтозидная группа, как отмечают авторы, способна дости-

гать места связывания типичных амфипатических лигандов ЦСЖК, конкурируя с ними за взаимодействие с ферментом [20, 42]. На структуре фермента из митохондрий примерно в этом же месте обнаружена молекула связанного фосфолипиды [20].

Нам удалось количественно охарактеризовать влияние тритона и додецилмальтозида на активность солюбилизированной ЦО. Как выяснилось (рис. 1, 2), додецилмальтозид предотвращает и обращает ингибирование фермента тритоном, конкурируя с ним за место связывания в соотношении 1/1. Неполное восстановление активности в присутствии ДМ после обработки ЦО тритоном можно объяснить, по крайней мере, частично, ингибирующим действием самого ДМ, добавленного в высокой концентрации (рис. 2, б). Важно отметить, что мы наблюдали модификацию эффекта тритона на оксидазную активность в присутствии не только ДМ, но и ионного детергента холата (неопубликованные данные). В этом случае имело место не ослабление ингибирования, а лишь замедление его развития. Так, ингибирующий эффект 1 мМ ТХ на фоне 3,2 мМ холата развивается в течение 40–60 с (сравн. с рис. 1, а, кривая 1, где ингибирующее действие 1 мМ ТХ на фоне 1 мМ ДМ развивается за время смешивания).

Конкурентные отношения между ТХ и ДМ, а также между ТХ и холатом указывают на то, что место связывания тритона совпадает или перекрывается с ЦСЖК. Действительно, в этом случае мальтозидная группа ДМ препятствовала бы связыванию ТХ (см. выше), уменьшая его эффективное сродство к ферменту и величину $K_{i(\text{app})}$. Сродство к ЦСЖК у тритона, по-видимому, существенно выше, чем у холата, поскольку в присутствии обоих лигандов ингибирующее действие ТХ развивается полностью, хотя и с задержкой.

В недавней работе Oleynikov et al. [46] мы впервые продемонстрировали, что ингибиторами ЦО из сердца быка могут быть стероидные гормоны. При этом, как и в случае с ТХ, додецилмальтозид ослаблял действие ингибитора, конкурируя с ним за связывание с ферментом в соотношении 1/1. Сродство к ЦО самого додецилмальтозида, полученное в настоящей работе (1,2 мМ, рис. 1, в), весьма близко к оценкам, сделанным на основании исследования его конкуренции с эстрадиолом (1,47 мМ) и с тестостероном (1,3 мМ). Интересно отметить, что очень близкими оказались также значения истинной константы ингибирования, полученные для ТХ (0,3 мМ, рис. 1, в) и для эстрадиола (0,37 мМ).

Сходство параметров ингибирования может указывать на определенное структурное сход-

ство ингибиторов — ТХ и эстрадиола. Несмотря на очевидную разницу в химическом строении молекул, это сходство может проявляться при пространственном взаимодействии лиганда с сайтом связывания. Гидрофобный фрагмент молекулы тритона представляет собой группу 4-трет-октилфенола — соединения, известного своей способностью связываться с рецепторами эстрогенов и имитировать их действие [47, 48]. Можно предположить, что эта же часть молекулы ТХ взаимодействует с ЦСЖК, заменяя собой природный лиганд стероидной природы. Что касается додецилмальтозида, то он часто рассматривается, как структурный аналог фосфолипиды [49]. Таким образом, описанное нами в этой работе влияние додецилмальтозида на связывание тритона с ЦО может имитировать естественную ситуацию, при которой эндогенный фосфолипид, связываясь вблизи сайта ЦСЖК, контролирует величину сродства ЦСЖК к природным амфипатическим лигандам (например, стероидам).

В цепочке переноса электронов между кофакторами ЦО (схема 1) тритон, судя по нашим данным, ингибирует перенос электрона с гема *a* на гем *a*₃. Об этом свидетельствует повышение уровня восстановления гема *a* в ферменте, работающем в стационарных условиях (рис. 3, а), а также уменьшение скорости восстановления гема *a*₃ при наступлении анаэробноза (рис. 3, б). К такому же выводу пришли ранее Antalik et al. [21], изучая кинетику восстановления гема *a*₃ в присутствии тритона X-100 методом быстрого смешивания. Замедление восстановления гема *a*₃ в опытах с использованием быстрого смешивания мы наблюдали и в случае взаимодействия ЦО с эстрадиолом [46]. Примечательно, что именно данная стадия внутримолекулярного транспорта электрона блокируется в ЦО из *R. sphaeroides* мутациями по ключевым остаткам протонного К-канала, в частности K362 и E101 [50, 51]. На основании этого совпадения можно предположить, что действие тритона влияет на функционирование К-канала.

Другая характерная особенность ингибирования, вызываемого мутациями по остаткам К-канала, состоит в том, что пероксидазная активность ЦО, в отличие от оксидазной, остается незатронутой [50, 51]. Это объясняется тем, что в пероксидазной фазе каталитического цикла перенос протонов в биядерный центр осуществляется не по К-, а по D-каналу [34, 50]. Как показано в нашей работе, пероксидазная активность окисленной ЦО проявляет значительную устойчивость к тритону в тех концентрациях, которые вызывают практически полное ингибирование оксидазной реакции (рис. 7, кривые 1 и 2). Это

наблюдение служит вторым серьезным аргументом в пользу того, что ингибирующее действие ТХ на оксидазную активность ЦО связано с нарушением работы протонного К-канала.

Косвенным свидетельством в пользу той же гипотезы можно считать и индуцируемый ТХ спектральный сдвиг полосы поглощения гема a_3 . Канал К доставляет протоны непосредственно в биядерный центр, и нарушение его проводимости под действием ТХ может повлиять на окружение высокоспинового гема, изменив распределение электронной плотности на лигандах и т.п.

Предположения о взаимодействии тритона с ЦСЖК и о его влиянии на К-канал хорошо согласуются друг с другом. В работах лаборатории Ferguson-Miller [42] отмечается близость ЦСЖК ко входу в К-канал и высказывается гипотеза о том, что некоторые амфипатические лиганды ЦСЖК могут нарушать перенос протонов в биядерный центр. Авторы предполагают, что причиной нарушения может быть как влияние на структуру водородных связей и ограничение подвижности молекул воды в канале, так и блокирование конформационных изменений в районе трансмембранной спирали VIII, сопряженных с восстановлением фермента и необходимых для быстрого проведения протонов к гему a_3 . Мутация по остатку Glu101 во второй субъединице ЦО из *R. sphaeroides* (считающемуся входным пунктом для протонов, поступающих в канал К [51]) оказывает на эффекты, вызываемые лигандами ЦСЖК, серьезное модулирующее влияние [44]. Сходство действия тритона с мутациями по остаткам К-канала впервые было отмечено в работе Antalik et al. [21], причем там же высказано предположение о связывании ТХ с ЦО в месте связывания холата. Любопытно, что авторы фактически приводят и данные об устойчивости к ингибированию тритоном пероксидазной активности ЦО, однако интерпретируют их как активацию перекисью оксидазной реакции с ферроцианидом в качестве донора. Мы предполагаем, что в действительности речь идет здесь о восстановлении H_2O_2 за счет окисления ферментом высокопотенциального донора (ферроцианида в присутствии значительного количества феррицианида).

Большой интерес представляет вопрос о месте действия ТХ в каталитическом цикле фермента. В работе Sadoski et al. [40] утверждается, что в присутствии тритона существенно ускоряется переход $F_{II-580} \rightarrow O_2$, что на схеме 2 соответствует реакции III. Однако этот результат получен при высокой (5%, т.е. 80 мМ) концентрации ТХ, вызывающей переход фермента в мономерную форму. При концентрации детергента, не-

достаточной для мономеризации (1%, т.е. 16 мМ ТХ), эффект ускорения практически отсутствует, а под действием 0,1% (1,6 мМ) ТХ процесс, напротив, замедляется (см. Table 1 в работе Sadoski et al. [40]). В опытах по определению влияния ТХ на распределение стационарных концентраций интермедиатов F_{I-607} и F_{II-580} в процессе титрования окисленного фермента H_2O_2 мы наблюдали ускорение исчезновения формы F_{I-607} (с переходом биядерного центра в форму F_{II-580}) в присутствии 6,4 мМ ТХ (рис. 6, а и б). Поскольку контрольный опыт показал, что ТХ не дестабилизирует интермедиат F_{I-607} химически (рис. 6, в), то эффект, наблюдаемый при титровании ЦО перекисью, можно объяснить лишь тем, что в условиях псевдокатализного цикла (схема 2) тритон ускоряет реакцию II (превращение $F_{I-607} \rightarrow F_{II-580}$). С другой стороны, ингибирование тритоном образования супероксида в условиях псевдокатализного цикла (рис. 7, кривая 3) указывает на замедление реакций II и/или III (схема 2). Наконец, каталазная активность ЦО, предположительно в равной степени сопряженная с реакциями II и III [33, 39], оказалась в два раза более устойчивой к действию тритона, чем оксидазная (рис. 8).

Обобщая имеющиеся данные по влиянию тритона на взаимодействие ЦО с перекисью, можно предположить, что наиболее вероятной мишенью действия ТХ является переход $F_{II-580} \rightarrow O_2$ (стадия III псевдокатализного цикла), что согласуется с работой Sadoski et al. [40]. В наших экспериментах торможением стадии III могло бы объясняться ингибирование тритоном генерации супероксида. Наблюдаемое в эксперименте подавление каталазной активности на 40% также качественно согласуется с ингибированием стадии III на 90% при сохранении или некотором увеличении скорости реакции на стадии II. Ингибирование тритоном превращения $F_{II-580} \rightarrow O_2$ происходит, очевидно, не только в псевдокатализном, но и в полном каталитическом цикле ЦО и может играть важную роль в механизме подавления активности фермента.

Таким образом, наши исследования взаимодействия тритона X-100 с солюбилизированной митохондриальной ЦО

(1) обнаружили наличие конкуренции в отношении 1/1 между тритоном X-100 и додецилмальтозидом, которая, по-видимому, имитирует естественную ситуацию регуляции активности фермента с участием лиганда ЦСЖК (например, стероидного гормона) и молекулы эндогенного фосфолипида, контролирующей эффективное сродство к лиганду;

(2) выявили у фермента, ингибированного тритоном, характерные признаки нарушения

работы протонного канала К (замедление реакции переноса электрона с гема *a* на гем *a*₃ и сохранение пероксидазной активности при полном подавлении оксидазной);

(3) на основании данных о взаимодействии фермента с H₂O₂ позволили сделать предположение о месте действия тритона в каталитическом цикле (ингибирование превращения интермедиатов F_{II}-580→Ox).

Полученные результаты представляются весьма существенными для понимания механизма эндогенной регуляции активности ЦО. Работа имеет и практическую ценность, поскольку тритон может оказаться удобным

инструментом для изучения К-канала митохондриальной ЦО, отчасти заменяющим невозможный в данном случае мутагенез.

Финансирование. Эта работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00063).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wikström, M., and Sharma, V. (2018) Proton pumping by cytochrome *c* oxidase – a 40 year anniversary, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1859**, 692-698, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.009.
- Siletsky, S., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
- Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
- Rich, P. R. (2017) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 813-829, doi: 10.1042/BST20160139.
- Sun, F. F., Prezbindowski, K. G., Crane, F. L., and Jacobs, E. E. (1968) Physical state of cytochrome oxidase. Relationship between membrane formation and ionic strength, *Biochim. Biophys. Acta*, **153**, 804-818, doi: 10.1016/0005-2728(68)90008-x.
- Lemberg, M. R. (1969) Cytochrome oxidase, *Physiol. Rev.*, **49**, 48-121, doi: 10.1152/physrev.1969.49.1.48.
- Van Buuren, K. J., and Van Gelder, B. F. (1974) Biochemical and biophysical studies on cytochrome *c* oxidase. XIII. Effect of cholate on the enzymic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **333**, 209-217, doi: 10.1016/0005-2728(74)90005-x.
- Soulimane, T. and Buse, G. (1995) Integral cytochrome-*c* oxidase. Preparation and progress towards a three-dimensional crystallization, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 588-595, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20429.x.
- Rosevear, P., Van Aken, T., Baxter, J., and Ferguson-Miller, S. (1980) Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **19**, 4108-4115, doi: 10.1021/bi00558a032.
- Soltysiak, D., and Kaniuga, Z. (1970) The effect of triton X-100 on the respiratory chain enzymes of a heart-muscle preparation, *Eur. J. Biochem.*, **14**, 70-74, doi: 10.1111/j.1432-1033.1970.tb00262.x.
- Teller, J. K., Ziemnicki, K., and Obuchowicz, L. (1980) The effect of triton X-100 on cytochrome oxidase activity in carp, frog and rat liver mitochondria, *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 747-750, doi: 10.1016/0305-0491(80)90192-3.
- Barbero, M. C., Valpuesta, J. M., Rial, E., Gurtubay, J. I., Goñi, F. M., and Macarulla, J. M. (1984) Effect of the nonionic detergent Triton X-100 on mitochondrial succinate-oxidizing enzymes, *Arch. Biochem. Biophys.*, **228**, 560-568, doi: 10.1016/0003-9861(84)90023-7.
- Sinjorgo, K. M., Durak, I., Dekker, H. L., Edel, C. M., Bieleman, A. H., et al. (1987) The effect of detergents on bovine cytochrome *c* oxidase: a kinetic approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **893**, 241-250, doi: 10.1016/0005-2728(87)90045-4.
- Mahapatro, S. N., and Robinson, N. C. (1990) Effect of changing the detergent bound to bovine cytochrome *c* oxidase upon its individual electron-transfer steps, *Biochemistry*, **29**, 764-770, doi: 10.1021/bi00455a025.
- Tarasev, M., and Hill, B. C. (2002) Detergent modulation of electron and proton transfer reactions in bovine cytochrome *c* oxidase, *Arch. Biochem. Biophys.*, **400**, 162-170, doi: 10.1016/S0003-9861(02)00011-5.
- Robinson, N. C., and Capaldi, R. A. (1977) Interaction of detergents with cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **16**, 375-381, doi: 10.1021/bi00622a006.
- Georgevich, G., Darley-Usmar, V. M., Malatesta, F., and Capaldi, R. A. (1983) Electron transfer in monomeric forms of beef and shark heart cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **22**, 1317-1322, doi: 10.1021/bi00275a001.
- Robinson, N. C., and Talbert, L. (1986) Triton X-100 induced dissociation of beef heart cytochrome *c* oxidase into monomers, *Biochemistry*, **25**, 2328-2335, doi: 10.1021/bi00357a005.
- Henderson, R., Capaldi, R. A., and Leigh, J. S. (1977) Arrangement of cytochrome oxidase molecules in two-dimensional vesicle crystals, *J. Mol. Biol.*, **112**, 631-648, doi: 10.1016/s0022-2836(77)80167-8.
- Qin, L., Mills, D. A., Buhrow, L., Hiser, C., and Ferguson-Miller, S. A. (2008) Conserved steroid binding site in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **47**, 9931-9933, doi: 10.1021/bi8013483.
- Antalik, M., Jancura, D., Palmer, G., and Fabian, M. (2005) A role for the protein in internal electron transfer to the catalytic center of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **44**, 14881-14889, doi: 10.1021/bi050824z.
- Bergmeyer, H. U., Gawehn, K., and Grassl, M. (1970) in *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmeyer, H. U., ed.) Verlag Chemie, Weinheim, p. 440.
- Fowler, L. R., Richardson, S. H., and Hatefi, Y. (1962) A rapid method for the preparation of highly purified cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 170-173, doi: 10.1016/0006-3002(62)90770-9.
- Vygodina, T. V., Kirichenko, A., and Konstantinov, A. A. (2014) Cation binding site of cytochrome *c* oxidase:

- progress report, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1188-1195, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.02.025.
25. Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (2007) Peroxidase activity of mitochondrial cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1056-1064, doi: 10.1134/s0006297907100045.
 26. Bielski, B. H., Shiue, G. G., and Bajuk, S. (1980) Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂- and O₂-radicals, *J. Phys. Chem.*, **84**, 830-833, doi: 10.1021/j100445a006.
 27. Hilbers, F., von der Hocht, I., Ludwig, B., and Michel, H. (2013) True wild type and recombinant wild type cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans* show a 20-fold difference in their catalase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 319-327, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.10.008.
 28. Nicholls, P., and Chanady, G. A. (1981) Interactions of cytochrome *aa*₃ with oxygen and carbon monoxide. The role of the 607 nm complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **634**, 256-265, doi: 10.1016/0005-2728(81)90144-4.
 29. Vanneste, W. H. (1966) The stoichiometry and absorption spectra of components *a* and *a*-3 in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **5**, 838-848, doi: 10.1021/bi00867a005.
 30. Vygodina, T. V., Dyuba, A. V., and Konstantinov, A. A. (2012) Effect of calcium ions on electron transfer between hemes *a* and *a*₃ in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **77**, 901-909, doi: 10.1134/S0006297912080111.
 31. Moody, A. J. (1996) "As prepared" forms of fully oxidised haem/Cu terminal oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 6-20, doi: 10.1016/0005-2728(96)00035-7.
 32. Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1988) H₂O₂-induced conversion of cytochrome *c* oxidase peroxy complex to oxoferryl state, *Ann. NY Acad. Sci.*, **550**, 124-138, doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb35329.x.
 33. Konstantinov, A. A., Capitanio, N., Vygodina, T. V., and Papa, S. (1992) pH changes associated with cytochrome *c* oxidase reaction with H₂O₂. Protonation state of the peroxy and oxoferryl intermediates, *FEBS Lett.*, **312**, 71-74, doi: 10.1016/0014-5793(92)81412-f.
 34. Konstantinov, A. (1998) Cytochrome *c* oxidase as a proton-pumping peroxidase: reaction cycle and electrogenic mechanism, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 121-130, doi: 10.1023/a:1020571930850.
 35. Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion, *FEBS Lett.*, **586**, 630-639, doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.037.
 36. Ksenzenko, M. Yu., Vygodina, T. V., Berka, V., Ruuge, E. K., and Konstantinov, A. A. (1992) Cytochrome oxidase-catalyzed superoxide generation from hydrogen peroxide, *FEBS Lett.*, **297**, 63-66, doi: 10.1016/0014-5793(92)80328-e.
 37. Jancura, D., Stanicova, J., Palmer, G., and Fabian, M. (2014) How hydrogen peroxide is metabolized by oxidized cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **53**, 3564-3575, doi: 10.1021/bi401078b.
 38. Bickar, D., Bonaventura, J., and Bonaventura, C. (1982) Cytochrome *c* oxidase binding of hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **21**, 2661-2666, doi: 10.1021/bi00540a013.
 39. Bolshakov, I. A., Vygodina, T. V., Gennis, R., Karyakin, A. A., and Konstantinov, A. A. (2010) Catalase activity of cytochrome *c* oxidase assayed with hydrogen peroxide-sensitive electrode microsensor, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1352-1360, doi: 10.1134/s0006297910110064.
 40. Sadoski, R. C., Zaslavsky, D., Gennis, R. B., Durham, B., and Millett, F. (2001) Exposure of bovine cytochrome *c* oxidase to high triton X-100 or to alkaline conditions causes a dramatic change in the rate of reduction of compound F, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33616-33620, doi: 10.1074/jbc.M103640200.
 41. Ferguson-Miller, S., Hiser, C., and Liu, J. (2012) Gating and regulation of the cytochrome *c* oxidase proton pump, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1817**, 489-494, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.018.
 42. Hiser, C., Buhrow, L., Liu, J., Kuhn, L., and Ferguson-Miller, S. (2013) A conserved amphipathic ligand binding region influences K-path-dependent activity of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **52**, 1385-1396, doi: 10.1021/bi3014505.
 43. Buhrow, L., Hiser, C., van Voorst, J. R., Ferguson-Miller, S., and Kuhn, L. A. (2013) Computational prediction and *in vitro* analysis of potential physiological ligands of the bile acid binding site in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **52**, 6995-7006, doi: 10.1021/bi400674h.
 44. Hiser, C., Liu, J., and Ferguson-Miller, S. (2018) The K-path entrance in cytochrome *c* oxidase is defined by mutation of E101 and controlled by an adjacent ligand binding domain, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1859**, 725-733, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.017.
 45. Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., and Mochizuki, M. (2012) Structural studies on bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1817**, 579-589, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.12.012.
 46. Oleynikov, I. P., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (2020) Interaction of cytochrome *c* oxidase with steroid hormones, *Cells*, **9**, 2211, doi: 10.3390/cells9102211.
 47. Madsen, L. L., Korsgaard, B., and Bjerregaard, P. (2003) Estrogenic effects in flounder *Platichthys flesus* orally exposed to 4-tert-octylphenol, *Aquatic Toxicol.*, **64**, 393-405, doi: 10.1016/s0166-445x(03)00106-1.
 48. Kennedy, R. H., Pelletier, J. H., Tupper, E. J., Hutchinson, L. M., and Gosse, J. A. (2012) Estrogen mimetic 4-tert-octylphenol enhances IgE-mediated degranulation of RBL-2H3 mast cells, *J. Toxicol. Environ. Health.*, **75**, 1451-1455, doi: 10.1080/15287394.2012.722184.
 49. Qin, L., Hiser, C., Mulichak, A., Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2006) Identification of conserved lipid/detergent-binding sites in a high-resolution structure of the membrane protein cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16117-16122, doi: 10.1073/pnas.0606149103.
 50. Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1998) Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **37**, 3053-3061, doi: 10.1021/bi971876u.
 51. Tomson, F. L., Morgan, J. E., Gu, G., Barquera, B., Vygodina, T. V., and Gennis, R. B. (2003) Substitutions for glutamate 101 in subunit II of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* result in blocking the proton-conducting K-channel, *Biochemistry*, **42**, 1711-1717, doi: 10.1021/bi026750y.

MECHANISM OF INHIBITION OF CYTOCHROME *c* OXIDASE BY TRITON X-100

I. P. Oleynikov^{1,2}, N. V. Azarkina^{2*}, T. V. Vygodina², and A. A. Konstantinov²

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia

² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: azarkina@yahoo.com

It is known that Triton X-100 (TX) reversibly inhibits activity of cytochrome *c* oxidase (CcO). The mechanism of inhibition is analyzed in this work. The action of TX is not directed to the reaction of CcO with cytochrome *c*, does not cause transition of the enzyme to the “slow” form, and is not associated with monomerization of the enzyme complex. TX completely suppresses oxygen reduction by CcO, but inhibition is prevented and partially reversed by dodecyl- β -D-maltoside (DDM), a detergent used to maintain CcO in solution. A 1/1 stoichiometry competition is shown between DDM and TX for binding to CcO, with $K_i = 0.3$ mM and affinity of DDM for the enzyme of 1.2 mM. TX interaction with the oxidized enzyme induces spectral response with maximum at 421 nm and $[TX]_{1/2} = 0.28$ mM, presumably associated with heme a_3 . When CcO interacts with excess of H_2O_2 TX affects equilibrium of the oxygen intermediates of the catalytic center accelerating the $F_{II-607} \rightarrow F_{II-580}$ transition, inhibits generation of O_2^- by the enzyme, and, to a lesser extent, suppresses the catalase partial activity. The observed effects can be explained by inhibition of the conversion of the intermediate F_{II-580} to the free oxidized state during the catalytic cycle. TX suppresses intraprotein electron transfer between hemes *a* and a_3 during enzyme turnover. Partial peroxidase activity of CcO remains relatively resistant to TX under conditions that block oxidase reaction effectively. These features indicate an impairment of the K proton channel conductivity. We suggest that TX interacts with CcO at the Bile Acid Binding Site (BABS) that is located on the subunit I at the K-channel mouth and contacts with amphipathic regulators of CcO [Buhrow et al. (2013) *Biochemistry*, **52**, 6995-7006]. Apparently, TX mimics the physiological ligand of BABS, whereas the DDM molecule mimics an endogenous phospholipid bound at the edge of BABS that controls effective affinity for the ligand.

Keywords: cytochrome *c* oxidase, Triton X-100, regulation, K-channel, amphipathic ligands