

УДК 577.152.123

ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРРИЛЬНОЙ ФОРМЫ Р-ТИПА ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗЫ БЫКА

© 2021 Л. Микулова¹, И. Пекова², Д. Янкура², М. Ступак³, М. Фабиан^{1*}

¹ Center for Interdisciplinary Biosciences, Technology and Innovation Park,
University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic; E-mail: marian.fabian@upjs.sk

² Department of Biophysics, Faculty of Science, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic

³ Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, 04011 Košice, Slovak Republic

Поступила в редакцию 28.08.2020

После доработки 25.11.2020

Принята к публикации 25.11.2020

Во время восстановления молекулы O₂ до H₂O наблюдаются несколько феррильных состояний каталитического центра гема *a*₃-Cu_B цитохром *c*-оксидазы (CcO) дыхательной цепи. Одна из феррильных форм Р-типа, Р_М, образуется в результате реакции двухэлектронного восстановленного CcO с O₂. В этом состоянии железо гема *a*₃ находится в феррильном состоянии. Также в каталитическом центре присутствует свободный радикал. Однако до сих пор экспериментально не установлена энергетика образования Р_М. В настоящей работе с помощью метода изотермической титрационной калориметрии и UV-Vis абсорбционной спектрофотометрии в оптическом диапазоне длин волн с примыкающей к нему ультрафиолетовой областью спектра было изучено образование состояния Р_М в реакции взаимодействия окисленной бычьей цитохром *c*-оксидазы (О) с одной молекулой H₂O₂. С помощью обоих методов были разделены две кинетические фазы, относящиеся к образованию Р_М, и его эндогенная конверсия обратно в состояние О. Величина ΔH всего процесса (–66 ккал/моль H₂O₂) превышала значение выделившегося тепла (–50,8 ккал/моль O₂) в реакции восстановления O₂ ферроцитохромом *c* (pH 8,25 °C). Интересно, что значение ΔH (–32 ккал/моль феррильного состояния), представляющее первую фазу, намного превышает энтальпию образования Р_М. Полученные данные показывают, что во время первой фазы радикал в состоянии Р_М фактически гасится и образуется спектрально аналогичная феррильная форма второго Р-типа (Р_В). Кроме того, было показано, что вклад энтропии в изменения энергии Гиббса (ΔG = –46 ккал/моль O₂) во время каталитического восстановления молекулы O₂ ферроцитохромом *c* минимален (–0,7 ккал/моль K).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *c*-оксидаза, перекись водорода, феррильное состояние, калориметрия изотермического титрования.

DOI: 10.31857/S0320972521010073

ВВЕДЕНИЕ

У аэробных организмов преобразование энергии происходит в дыхательных цепях, состоящих из организованных трансмембранных ферментативных комплексов. Терминальный комплекс в большинстве этих цепей принадлежит к суперсемейству гем-медных оксидаз (НСО, heme-copper oxidases), которые восстанавливают молекулярный кислород до воды. Это суперсемейство выделяется наличием низкоспинового гема и каталитического центра, состоящего из высокоспинового гема и иона меди [1, 2]. Кроме того, редокс-активный остаток

Туг локализуется очень близко к каталитическому центру фермента. Этот Туг ковалентно связан с одним His, связывающим ион меди в каталитическом центре фермента. НСО подразделяют на три подкласса: А, В и С. К оксидазам типа А относятся оксидазы цитохрома *c* (CcO) в митохондриях и некоторых типах бактерий. Гем-медные оксидазы В- и С-типа обнаружены только у бактерий и архей [1, 2].

Энергия, выделяемая оксидазой в процессе восстановления молекулы O₂ до воды, преобразуется в трансмембранный протонный градиент. Этот градиент создается двумя различными механизмами [3, 4]. Один механизм включает окисление цитохрома *c* на одной стороне мембраны (Р-сторона, митохондриальное межмембранное пространство или периплазма у бактерий) и потребление протонов для синтеза молекулы воды на другой стороне мембраны (N-сторона, митохондриальный матрикс или цитоплазма у бактерий). Второй механизм – это пе-

Принятые сокращения: CcO – цитохром *c*-оксидаза; c²⁺ – ферроцитохром *c*, восстановленный цитохром *c*; Fe_a – ион железа цитохрома *a*; Fe_{a3} – ион железа цитохрома *a*₃; НСО – гем-медные оксидазы; ИТС – изотермическая титрационная калориметрия; КРi – калий-фосфатный буфер; ТХ – Triton X-100.

* Адресат для корреспонденции.

рекачка протонов, которая связывает окислительно-восстановительную реакцию (окислительные реакции) Cso с трансмембранным переносом протонов с N- на P-сторону мембраны. Эффективность перекачки протонов зависит от типа НСО. В оксидазах А-типа на каждый электрон, перенесенный в каталитический центр фермента, в среднем накачивается один протон [3, 5]. Однако оксидазы В- и С-типа не столь эффективны и перекачивают H^+ с более низкой стехиометрией [6, 7].

Митохондриальная Cso катализирует окисление ферроцитохрома c молекулярным кислородом. В Cso перенос электрона от ферроцитохрома c на O_2 облегчается четырьмя редокс-центрами: Cu_A , цитохром a , цитохром a_3 и Cu_B . Двухядерный центр меди Cu_A является первым акцептором электронов от ферроцитохрома c . Эти электроны быстро распределяются между Cu_A и ионом железа цитохрома a (Fe_a) [8–10]. Затем межбелковый перенос электронов продолжается от Fe_a на окисленный каталитический двухядерный центр гема a_3 - Cu_B . В этом центре происходит восстановление кислорода до воды, а также ингибирование активности Cso экзогенными лигандами (например, цианидом и азидом).

Процесс восстановления O_2 осуществляется последовательностью спектрально различных интермедиатов каталитического центра Fe_{a_3} - Cu_B [4, 11, 12]. Наиболее загадочными и важными в процессе превращения энергии являются два вида феррильных интермедиатов: **P** и **F** [13, 14]. Эти феррильные состояния образуются определенным числом электронов и протонов, поставляемых в каталитический центр фермента во время превращения O_2 в H_2O .

Восстановление O_2 начинается, когда оба металла в каталитическом центре находятся в восстановленном состоянии (**R**-состояние)

(рис. 1). Непосредственным продуктом этой реакции является первое феррильное состояние, в силу исторических причин называемое «регоху» (**P_M**). Хотя всего два «внешних» электрона доступны для образования состояния **P_M**, в действительности происходит четырехэлектронное восстановление O_2 . В результате этого восстановления происходит расщепление связи между атомами кислорода [15–17]. Один из двух дополнительных электронов, необходимых для четырехэлектронного восстановления O_2 , поступает от иона железа цитохрома a_3 (Fe_{a_3}) [15, 17], а второй электрон, скорее всего – от $\text{Tyr}244$ (нумерация остатков по последовательности Cso быка) [18, 19], расположенного вблизи от каталитического центра.

Перенос другого электрона от цитохрома a в каталитические центры **P_M** должен привести к восстановлению радикала Tyr (YO^\bullet) и образованию тирозината (YO^-) [4, 19]. Поскольку феррильное состояние имеет те же спектральные характеристики, что и **P_M**, оно было названо **P_R** [20, 21] (более подробно о различиях см. Einarisdóttir et al. [22]). Образование **P_R** сопровождается поглощением 2 H^+ с N-стороны мембраны, и второй тип феррильного промежуточного продукта, тип **F**, производится без какого-либо переноса электронов. Один из двух абсорбированных протонов используется для образования воды в каталитическом центре Fe_{a_3} - Cu_B , а другой протон подлежит перекачке (рис. 1) [23–26]. Каталитический цикл завершается одноэлектронным восстановлением **F**-формы. Переход **F**-формы в окисленное состояние Cso (**O**) также сопровождается захватом двух протонов на N-стороне. И снова один H^+ используется для синтеза воды, а второй – перекачивается [23–26].

Аналогичные феррильные интермедиаты были также идентифицированы в НСО В- и С-

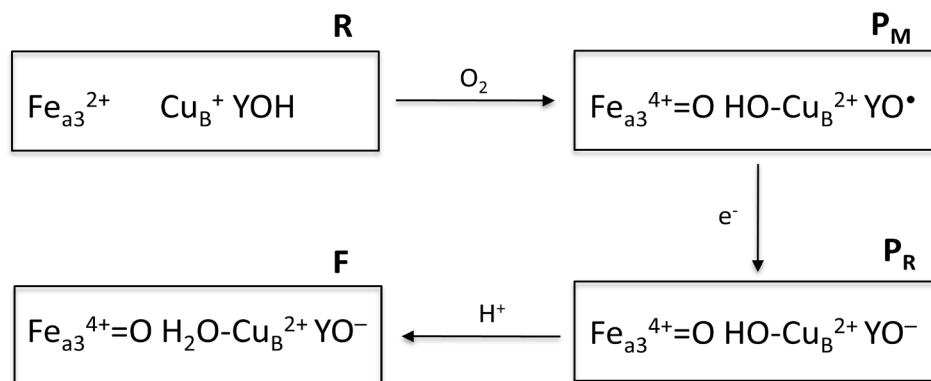


Рис. 1. Предполагаемая структура феррильных интермедиатов каталитического центра, образующихся в ходе реакции восстановленной цитохром c -оксидазы с O_2

типа и даже в неканонических цитохром *bd*-оксидазах. Наличие форм P_M [27], P_R [28–30] и F [30] было показано для НСО В-типа, использующего *ba*₃-оксидазу из *Thermus thermophilus*. Для семейства НСО С-типа вычислительные исследования, проведенные для *cbb3*-оксидазы *Pseudomonas strutzeri*, показали, что состояние, эквивалентное P_M , является энергетически неблагоприятным, и оно не должно образовываться. Связь в молекуле кислорода разрывается на уровне феррильного интермедиата F -типа в тот момент, когда три внешних электрона и протона поступают в каталитический центр [31].

Феррильное состояние с π -катион-радикалом гема *d* ($Fe_d^{4+} = O \pi^+$) было обнаружено во время реакции полностью восстановленной *bd*-оксидазы с молекулой O_2 [32]. Эта форма аналогична соединению I пероксидазы хрена или P_M -форме бычьей СсО. Последующее одноэлектронное восстановление ($Fe_d^{4+} = O \pi^+$) приводит к образованию феррильного состояния без образования радикала ($Fe_d^{4+} = O$). Однако, по-видимому, состояние ($Fe_d^{4+} = O \pi^+$) не может являться физиологическим интермедиатом, поскольку оно не обнаруживается в стационарных условиях. Во время оборота *bd*-оксидазы определялись только феррильная ($Fe_d^{4+} = O$) и феррооксо ($Fe_d^{2+} - O_2$) формы [33, 34].

Несмотря на ключевую роль феррильных состояний в каталитическом центре и перекачивании протонов цитохром *c*-оксидазой, термодинамические характеристики их образования и взаимные превращения экспериментально не определены. В настоящей работе нами был использован метод изотермической титрационной калориметрии, чтобы определить энтальпию процесса образования состояния P_M в ходе реакции окисленной цитохром *c*-оксидазы с H_2O_2 . Кроме того, нами было показано, что каталитическое восстановление O_2 в СсО четырьмя молекулами ферроцитохрома *c* в основном обусловлено изменением энтальпии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), Trizma (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) и феррицианид калия («Sigma-Aldrich», США); Triton X-100 (ТХ) поступил от Roche Diagnostics («Roche», Швейцария); раствор перекиси водорода (~30%) («Fluka», США).

Цитохром *c*-оксидаза сердца быка была очищена из митохондрий с использованием ранее описанного метода [35] с небольшими измене-

ниями в 10 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 50 мМ K_2SO_4 и 0,1% (w/v) ТХ. Препарат очищенной СсО замораживали в жидком азоте и хранили при $-80^\circ C$. Концентрацию СсО определяли по спектру поглощения окисленного фермента в ближнем ультрафиолете и видимой области (UV-Vis), используя коэффициент экстинкции ϵ (424 нм), равный $156 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ [36].

Изотермическая титрационная калориметрия (ИТС). Метод ИТС был использован для определения значений энтальпии двух реакций. Первое значение – это ΔH окисления ферроцитохрома *c* (c^{2+}) молекулой O_2 , катализируемое СсО; второе – энтальпия образования феррильного состояния P_M в реакции между окисленной СсО (O) и H_2O_2 .

Энтальпию реакции окисления c^{2+} (21 мкМ) цитохром *c*-оксидазой (51 нМ) измеряли в насыщенном воздухом буфере (40 мМ калий-фосфатный буфер (КРi), pH 8,0, 0,1% (w/v) ТХ, 0,5 мкМ каталазы). Кювету ИТС (0,2 мл) заполняли раствором восстановленного цитохрома *c* (c^{2+}), и запускали реакцию его окисления добавлением 2 мкл раствора цитохром *c*-оксидазы (5,22 мкМ) в течение 2 с. Цитохром *c* и цитохром *c*-оксидаза находились в одном и том же буфере. Значение энтальпии реакции определяли как отношение количества выделившегося тепла (мккал) к количеству c^{2+} (моль) в кювете.

При измерении энтальпии образования формы P_M с помощью метода ИТС очищенную СсО (150–250 мкМ) полностью окисляли при инкубации с 10 мМ феррицианида калия в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем феррицианид калия удаляли при пропускании образцов через обессоливающую колонку PD-10 («Amersham Biosciences Inc.», Швеция), используя 40 мМ (КРi), pH 8,0, содержащий 0,1% ТХ. Этот препарат окисленной СсО далее использовали в измерениях ИТС.

Образование P_M при ИТС запускалось однократным введением 2,5 мкл H_2O_2 (431 мкМ) в течение 2 с в кювету (200 мкл), заполненную раствором окисленной СсО (54 мкМ). Как СсО, так и раствор перекиси водорода были приготовлены на одном и том же буфере (40 мМ КРi, pH 8,0, 0,1 % ТХ). Все измерения ИТС проводили на приборе MicroCal ITC 200 («GE Healthcare», США) при $25^\circ C$.

Кинетическая кривая реакции перекиси водорода с окисленной СсО состоит из двух фаз, относящихся к быстрому образованию P_M с последующим более медленным эндогенным переходом в состояние O . Чтобы определить количество выделенного тепла в первой фазе, образование феррильного состояния, вся кинетика ИТС была разбита на кривую, представляющую

образование P_M и кривую, представляющую его эндогенный распад (см. «Результаты исследования»). Поскольку площадь под кривой ИТС представляет выделенную теплоту, то площадь под кривой первой фазы была определена путем интегрирования с использованием графической программы Igor («WaveMetrics», США). Тогда отношение этой теплоты к количеству феррильных форм ($P_M + F$), определенное в ходе параллельных измерений с помощью метода УФ-спектроскопии поглощения (UV-Vis), представляет изменения энтальпии для образования этих феррильных состояний.

Абсорбционная UV-Vis спектроскопия. Оценка реакции между окисленной формой CcO и H_2O_2 также была произведена с использованием спектрометра с диодной матрицей Spesord S600 («Analytik Jena», Германия). После смешивания перекиси водорода и окисленной CcO каждые 10 с регистрировали спектры поглощения в диапазоне 400–700 нм. На основе накопленных спектров далее были получены данные кинетики спектральных изменений ($\Delta\lambda$ 607–630 нм) и абсолютные спектры CcO в определенные моменты времени протекания реакции.

Несмотря на то, что подобранные экспериментальные условия благоприятствуют образованию состояния P_M , реакция окисленной CcO с H_2O_2 приводит также к образованию второго типа феррильной формы – состоянию F [37]. Состав продукта реакции, выраженный в виде концентраций P_M и F , можно определить по дифференциальному спектру поглощения UV-Vis [38]. Этот дифференциальный спектр был получен путем вычитания исходной окисленной формы CcO из спектра CcO, обработанной H_2O_2 . Концентрацию P_M рассчитывали по этому дифференциальному спектру с использованием $\Delta\epsilon$ (607–630 нм) = 11 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [12]. Общее количество CcO, вступившей в реакцию с H_2O_2 , и сумму P_M и F определяли по тому же спектру с использованием $\Delta\epsilon$ (438–413 нм) = 67 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [38].

Приготовление реактивов. Приобретенный препарат H_2O_2 разводили деионизированной водой и определяли концентрацию полученного раствора по значению оптического поглощения при 240 нм с использованием ϵ (240 нм) = 40 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [39]. Из разведенного раствора перекиси водорода приготавливали аликваты (100 мкл (431 мкМ) H_2O_2 в 40 мМ KPi, pH 8,0), которые замораживали в жидком азоте и хранили при -80°C . Для проведения каждой реакции с CcO использовали новую аликвоту замороженного раствора H_2O_2 .

Ферроцитохром c (c^{2+}) получали восстановлением феррицитохрома c (c^{3+}) небольшим ко-

личеством сухого дитионита и последующим обессоливанием образца на колонке PD-10 («Amersham Biosciences Inc.», Швеция), уравновешенной 40 мМ KPi, pH 8,0. Концентрацию c^{2+} определяли по дифференциальному спектру: восстановленный минус окисленный цитохром c с использованием значения $\Delta\epsilon$ (550–542 нм) = 20 $\text{mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Термодинамика каталитического оборота CcO.

Как можно было ожидать, окисление ферроцитохрома c (c^{2+}) с помощью CcO сопровождается высвобождением теплоты (рис. 2). Об этом свидетельствуют отрицательные значения скорости нагрева, наблюдаемые после первого введения CcO в кювету ИТС, заполненную c^{2+} . Последующее идентичное введение CcO после полного завершения окисления c^{2+} было использовано для определения комбинированной теплоты для смешивания, разведения и, возможно, для связывания окисленного цитохрома c с CcO. Величина поглощенной теплоты в этих контролях составляла ~3% от теплоты, высвобожденной в ходе окисления c^{2+} . Тем не менее это небольшое количество было добавлено к количеству теплоты, выделившегося в процессе окисления c^{2+} .

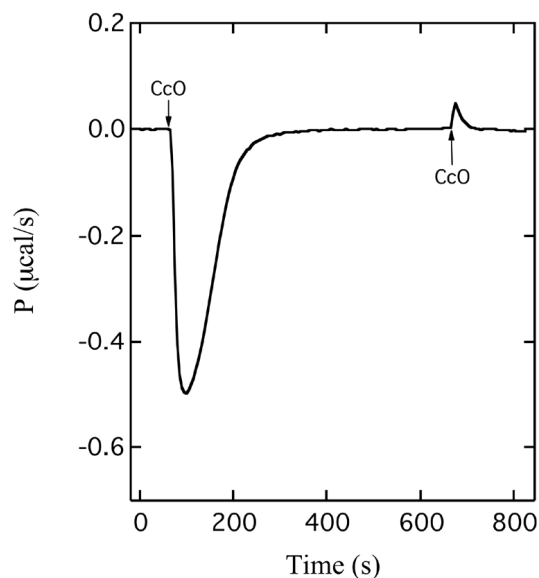


Рис. 2. Выделение теплоты во время оборота цитохром c -оксидазы. Окисление ферроцитохрома c (21 мкМ) с помощью CcO (51 нМ) регистрировалось с использованием калориметра изотермического титрования при 25°C . Две стрелки (CcO) показывают время введения 2 мкл окисленной CcO (5,22 мкМ) в реакционную кювету, заполненную цитохромом c . Использован буфер, содержащий 40 мМ KPi, pH 8,0, 0,1% ТХ и 0,5 мкМ каталазы

С этой поправкой была определена энтальпия реакции $\Delta H = -11,5 \pm 0,3$ ккал/моль c^{2+} .

Однако окисление одной молекулы c^{2+} молекулой O_2 связано с извлечением одного протона из фосфатного буфера для образования молекулы воды. Таким образом, значение $\Delta H = -11,5$ ккал/моль необходимо скорректировать с учетом энтальпии ионизации буфера ($\Delta H = +1,22$ ккал/моль) [41]. После этой корректировки энтальпия окисления c^{2+} молекулой O_2 составляет $-12,7$ ккал/моль c^{2+} ($-0,55$ эВ). Тогда $\Delta H = -50,8$ ккал/моль ($-2,2$ эВ) соответствует общему восстановлению O_2 четырьмя c^{2+} при pH 8,0 и 25 °C. $\Delta H = -16,7$ ккал/моль c^{2+} было определено в более ранних исследованиях с применением метода ИТС в немного отличающихся условиях (pH 7,4, 23 °C) [41].

Определив ΔH , есть возможность рассчитать величину изменения энтропии реакции (ΔS) с помощью известной формулы расчета изменений энергии Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Значение ΔG может быть рассчитано по формуле $\Delta G = -nF\Delta E_m$, где n – это число электронов, перенесенных в окислительно-восстановительной реакции ($n = 4$), F – это постоянная Фарадея (96 485 Дж/(моль В)) и ΔE_m представляет разность потенциалов средней точки между акцептором электронов (пара O_2/H_2O) и донором электронов (c^{3+}/c^{2+}). Пара O_2/H_2O имеет потенциал средней точки при pH 8,0, равный +755 мВ ($E_{m,8}$) при летучести кислорода в 1 атм., что соответствует 1,2 мМ O_2 в растворе при 25 °C. Поскольку наши измерения были проведены в насыщенном воздухом буфере при концентрации $O_2 \sim 0,25$ мМ, этот потенциал должен понизиться на 10 мВ [4]. Таким образом, в этих условиях (pH 8,0, 0,25 мМ O_2 , 25 °C) потенциал средней точки пары O_2/H_2O составляет +745 мВ. Принимая во внимание значение +245 мВ для E_m цитохрома *c* [40], значение ΔE_m будет равно +500 мВ. Эта разница составляет $\Delta G \sim 46$ ккал/моль O_2 ($-2,0$ эВ). Следовательно, вклад энтропии в энергию Гиббса будет равен всего +4,8 ккал/моль O_2 ($\sim 10\%$), что соответствует изменению энтропии $\Delta S = -0,7$ ккал/моль $^{-1} \cdot K^{-1}$. Малая величина ΔS означает, что изменение энтальпии является основной движущей силой процесса восстановления молекулы O_2 ферроцитохромом *c*.

При физиологических условиях оборот цитохром *c*-оксидазы, погруженной в мембрану, связан с генерацией трансмембранного градиента H^+ . Этот градиент образуется в результате абсорбции протонов с одной стороны мембраны и их высвобождением на другой стороне мембраны. Наши данные предполагают, что формирование этого градиента обусловлено главным

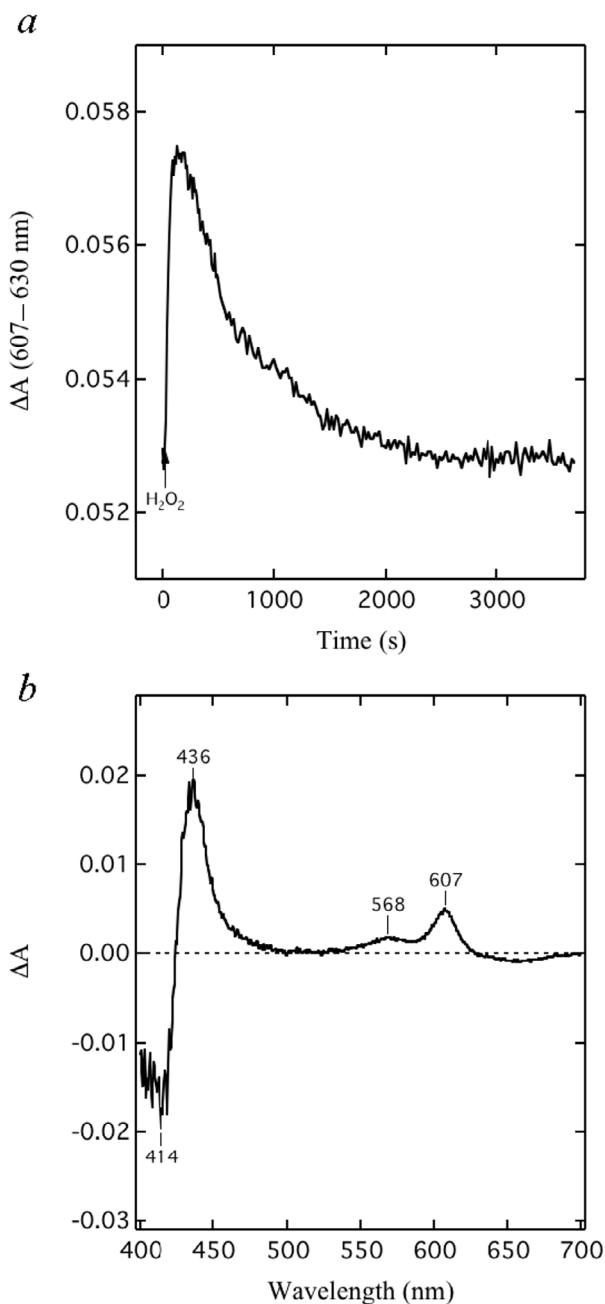


Рис. 3. Получение феррильного состояния P_M цитохром *c*-оксидазы в реакции с перекисью водорода: спектральные измерения. *a* – Кинетика образования и эндогенного распада P_M , образованного в реакции окисленной CcO (54 мкМ) с H_2O_2 (5,3 мкМ) при 25 °C. Стрелка (H_2O_2) показывает время добавления перекиси водорода. *b* – Дифференциальный спектр, полученный в результате вычитания спектра исходной окисленной CcO из спектра, полученного в тот момент времени (180 с), когда изменение величины поглощения ΔA (607–630 нм) достигло своего максимума. Состав буфера такой же, как указано на рис. 2

образом изменением энтальпии в ходе восстановления O_2 .

Термодинамика феррильной формы P_M . Взаимодействие окисленной CcO с одной молеку-

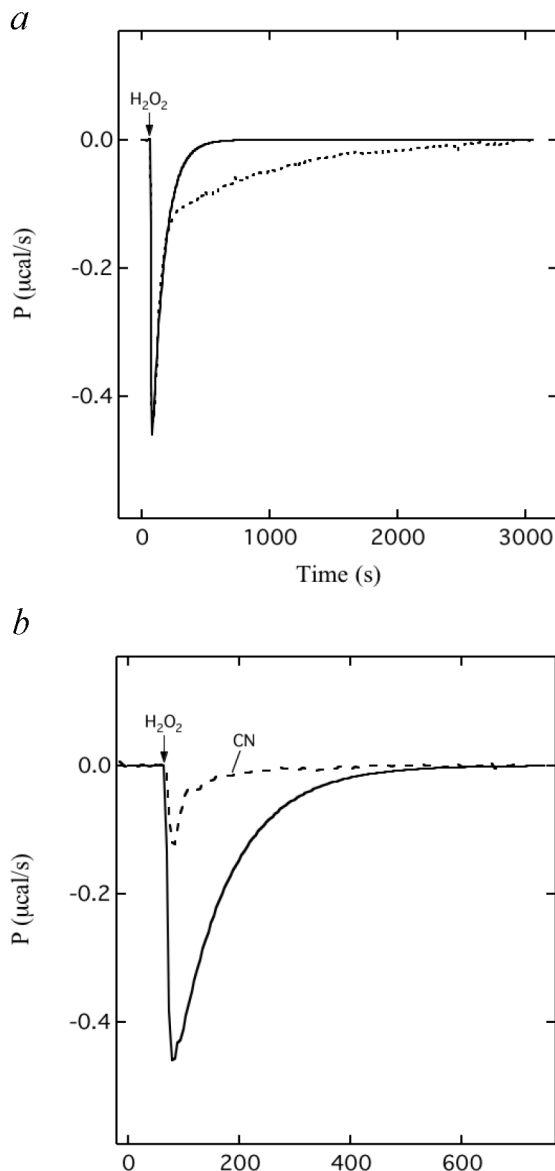


Рис. 4. Образование феррильного состояния P_M цитохром *c*-оксидазы перекисью водорода: калориметрические измерения. *a* – Временная зависимость скорости тепловыделения после введения перекиси водорода (5,3 мкМ) в реакционную кювету с окисленной СсО (54 мкМ) при 25 °С. Пунктирная линия – измеренная кинетическая кривая полного тепловыделения. Сплошная линия – тепловыделение, связанное с образованием P_M . *b* – Кинетическая кривая образования P_M , приведенная выше (сплошная линия) вместе со скоростью тепловыделения, наблюдаемой при реакции цианид-лигированного СсО с H_2O_2 (пунктирная линия). Цианидный комплекс (54 мкМ СсО–СN) реагировал с 9,6 мкМ H_2O_2 в буфере, содержащем 2 мМ KCN. Стрелками (H_2O_2) показано время введения перекиси водорода (2,5 мкл в течение 2 с). Состав буфера такой же, как указано на рис. 2

лой H_2O_2 при щелочных значениях pH приводит к образованию феррильного состояния каталитического центра, которое эквивалентно форме P_M [38, 42]. Это процесс при pH 8,0 представ-

лен на рис. 3, *a*, на котором ход реакции показан в виде изменения спектра поглощения ΔA (607–630 нм) с течением времени. Спектральные изменения происходили в двух различных фазах. Первоначальное увеличение значения ΔA (607–630 нм) после добавления 5,3 мкМ H_2O_2 к окисленной форме СсО (54 мкМ) отражает образование формы P_M . Затем P_M эндогенно распадается с образованием снова формы *O*. Этот переход, представленный снижением поглощения ΔA (607–630 нм), в данных условиях происходит в течение примерно одного часа.

Доминирующее образование состояния P_M подтверждено дифференциальными спектрами СсО (рис. 3, *b*). Эти спектры получали в результате вычитания спектра окисленной СсО из спектра, полученного в момент времени, когда значение ΔA (607–630 нм) достигло своего максимума (180 с после добавления H_2O_2).

По спектральному изменению полосы Core было установлено, что всего 5,2 мкМ СсО вступило в реакцию с H_2O_2 (сумма концентраций P_M и *F*). По дифференциальному спектру ΔA (607–630 нм) установлено, что 4,7 мкМ СсО находится в состоянии P_M . Таким образом, продукт реакции состоит из двух феррильных форм [~90% формы P_M (4,7 мкМ) и ~10% формы *F* (0,5 мкМ)].

Эта реакция также была проведена на калориметре для изотермического титрования (рис. 4). Зависимость скорости тепловыделения от времени также показывает две фазы. Отрицательные значения скорости, которые наблюдались во время всего процесса в целом, показали, что тепло выделяется в обеих фазах. Общее количество выделившегося тепла, представленного площадью под всей кривой, составляет –66 ккал/моль H_2O_2 .

Очевидно, быстрая фаза наблюдаемого процесса соответствует образованию феррильных состояний, а более медленная фаза – их возвращению результате распада в состояние *O*. Сразу после введения H_2O_2 , скорость тепловыделения возрастает до максимума, поскольку она пропорциональна скорости образования феррильных состояний, которая находится на максимуме в начале реакции. Следующее снижение между 60 и 180 с связано со снижением скорости образования этих феррильных форм. Если реакция останавливается на стадии образования феррильных состояний, то её скорость должна упасть от максимума до нуля в моноэкспоненциальном процессе. Однако такое резкое снижение не наблюдается, так как есть вклад второго процесса, связанного с выделением тепла в результате эндогенного распада феррильных состояний обратно в состояние *O*. Поэтому что-

бы получить кривую ИТС, касающуюся только образования феррильных форм, данные кинетики в диапазоне 60–180 с были обработаны с помощью моноэкспоненциальной функции. Также была построена полная кривая, состоящая из двух сегментов, представляющая образование феррильных состояний в диапазоне от нуля до 3000 с. Первый сегмент представлял действительные данные ИТС вплоть до 180 с. Второй сегмент включал данные, полученные в диапазоне 180–3000 с, и содержал данные моноэкспоненциальной функции.

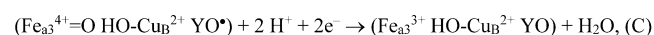
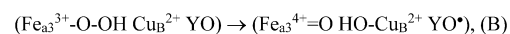
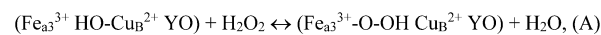
Кривая ИТС для образования P_M представлена в виде пунктирной линии на рис. 4. Площадь под этой кривой означает изменение энтальпии, равное $-34,6$ ккал/моль феррильных состояний в этом конкретном случае. Среднее значение, равное $-35,0 \pm 3,2$ ккал/моль феррильных состояний, было получено в результате трех независимых измерений с использованием двух различных препаратов СсО. Эта разница значения энтальпии представляет комбинированную теплоту образования P_M (~90%) и F (~10%).

Контрольные измерения ИТС показали, что тепловыделение существенно ингибируется, если в реакции с H_2O_2 используется комплекс окисленной СсО с цианидом (СсО–СN) (рис. 4, *b*). Для цианид-лигированного СсО было определено изменение энтальпии, равное примерно $-3,0$ ккал/моль H_2O_2 . Таким образом, после вычитания этой неспецифической теплоты конечное изменение энтальпии $\Delta H = -32$ ккал/моль феррильных состояний обусловлено образованием феррильных состояний, а значение ΔH , равное -34 ккал/моль, соответствует их эндогенному превращению в O -состояние.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Феррильные интермедиаты, полученные реакцией окисленной СсО с H_2O_2 , часто используются для изучения естественных каталитических интермедиатов этого фермента [42–45]. В настоящей работе для получения феррильного состояния P_M была использована реакция субстехиометрического количества H_2O_2 с окисленной СсО при щелочных значениях рН. Чтобы исключить множественные взаимодействия одной молекулы СсО с перекисью водорода, использовали низкие концентрации H_2O_2 относительно концентрации фермента. Как показывает измерение поглощения UV-Vis (рис. 3, *b*), после обработки перекисью водорода и образования феррильных форм СсО снова возвращается в полностью окисленное состояние.

Существует несколько предполагаемых структур каталитического центра в случае состояний P_M и F [4, 12, 45, 46]. Общую реакцию O с H_2O_2 в каталитическом центре можно проиллюстрировать следующей схемой:



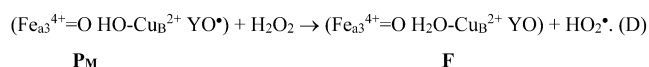
где первая стадия (A) — обратимое связывание H_2O_2 с окисленным каталитическим центром (интермедиат P_0) [12]. Этот комплекс очень нестабилен и в ходе окислительно-восстановительной реакции дает начало феррильной форме P_M и радикалу остатка Туг (YO^*) (B). После двухэлектронного эндогенного восстановления P_M окисленный каталитический центр СсО регенерируется и пероксид полностью восстанавливается до воды (C).

Представленная выше схема общей реакции в каталитическом центре создает впечатление полного восстановления окисленной СсО. Однако ранее мы показали, что обработка СсО субмиллимолярными концентрациями H_2O_2 вызывает снижение её каталитической активности. Таким образом, внутренняя пероксидазная активность связана с необратимой модификацией СсО [47].

Изменение энтальпии для эндогенного восстановления H_2O_2 ($\Delta H = -66$ ккал/моль H_2O_2 ($-2,9$ эВ)) превышает значение энтальпии, определенной для общей реакции восстановления O_2 четырьмя молекулами ферроцитохромов ($\Delta H = -50,8$ ккал/моль O_2 ($-2,2$ эВ)). Большее абсолютное значение ΔH , полученное в случае восстановления H_2O_2 до воды, скорее всего, является результатом участия в этих двух процессах различных доноров электронов. При эндогенном восстановлении H_2O_2 конечные доноры электронов должны иметь более низкие потенциалы средней точки, чем у цитохрома *c* (+245 мВ). Например, остатки Cys [48] и Met с потенциалами средней точки около -250 мВ удовлетворяют этому требованию.

Из общего изменения энтальпии (-66 ккал/моль H_2O_2) значение $\Delta H = -32$ ккал/моль прореагировавшей СсО ассоциировано с образованием двух феррильных состояний: P_M (90%) и F (10%). Меньшая фракция F , вероятно, обусловлена реакцией P со второй молеку-

лой H_2O_2 [37, 42, 47, 49, 50]. Было высказано предположение, что превращение P_M , стимулируемое H_2O_2 , является окислительно-восстановительной реакцией (D) [51, 52]:



В этом случае происходит перенос атома водорода от H_2O_2 на радикал Tug244 и высвобождается супероксид. Теплоту, выделяющуюся при переносе атома водорода, можно рассчитать из разницы между значениями ΔH диссоциации связи $\text{H}-\text{O}$ в H_2O_2 (~88 ккал/моль) и фенолах (~90 ккал/моль) [53]. Исходя из этих значений, перенос атома H должен привести к высвобождению примерно -2 ккал/моль H_2O_2 . Тогда вклад этого превращения в определяемое значение ΔH пренебрежительно мал ($-0,2$ ккал/моль), поскольку только 10% P_M превращается в F . Следовательно, наблюдаемое значение ΔH (-32 ккал/моль прореагировавшей CсO) в основном представляет энтальпию, связанную с переходом из O -состояния в P_M .

Значение ΔH (-32 ккал/моль для P_M) можно рассматривать как результат протекания, по крайней мере, двух процессов. Одним из них является обратимое связывание H_2O_2 с каталитическим центром $\text{Fe}_{a3}-\text{Cu}_b$ и образование P_0 . Второй процесс – это окислительно-восстановительная реакция. Насколько нам известно, пока нет экспериментальных данных по энтальпии реакции для какого-либо из этих двух процессов или энтальпии всей реакции CсO с H_2O_2 . Однако теоретические расчеты показали, что превращение P_0 в P_M -состояние должно быть связано с изменением энергии Гиббса менее чем на -10 ккал/моль [54, 55]. Так как предполагаемые изменения энтропии при этом переходе минимальны [56], значения ΔH и ΔG должны быть очень близки. Основываясь на этом допущении, величина ΔH связывания перекиси водорода с окисленной CсO должна составлять -22 ккал/моль. Однако и знак, и величина этого ΔH не согласуется с опубликованными данными, полученными для связывания H_2O_2 с различными гемовыми белками. Измерения с использованием мутанта человеческого миоглобина (His64Gly) [57], Mn-восстановленного миоглобина [58], пероксидазы хрена при минусовых температурах [59] и Mn-восстановленной пероксидазы хрена [60] показали только положительные величины ΔH со значениями от нуля до $+4$ ккал/моль.

Чтобы устранить это несоответствие, мы предположили, что наблюдаемая большая величина ΔH (-32 ккал/моль P_M) включает в себя

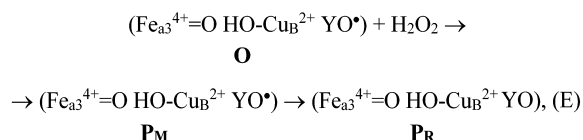
также тепло, высвобождаемое в ходе нескольких дополнительных реакций. В результате многочисленных экспериментальных наблюдений можно предположить, что радикал Tug в каталитическом центре CсO , образующийся при реакции окисленной CсO с H_2O_2 , менее стабилен, чем феррильное состояние. Это предположение основано на наблюдениях различных типов и количеств свободных радикалов [38, 61–64], изучении миграции радикалов и модификации нескольких находящихся на удалении остатков Tgr и связанных с ними фосфолипидов [65–67] при взаимодействии окисленного CсO с H_2O_2 . Кроме того, наше предыдущее исследование показало, что через несколько минут (~5 мин) после образования P_M при 4°C большая часть радикалов (~70%) удаляется из каталитического центра [68].

Такое поведение радикала Tug, обладающего меньшей стабильностью по сравнению с железом в феррильном состоянии, очень похоже на поведение первичных радикалов в миоглобинах [69–71], гемоглобинах [72–75], цитохром c -пероксидазе [76], аскорбатпероксидазе [77], пероксидазе хрена [78] и простагландин H -синтазе [79]. Поэтому мы пришли к выводу, что большая величина ΔH (-32 ккал/моль из P_M) является следствием комбинированной теплоты реакции образования состояния P_M и миграции радикалов из каталитического центра $\text{Fe}_{a3}-\text{Cu}_b$, вероятно, также связанной с его тушением. Возможно, часть радикалов может быть восстановлена в результате обычного переноса электронов, поступивших из следов примесей в буферных растворах.

Радикал Tug также играет ключевую роль в некоторых предложенных механизмах перекачки протонов с участием CсO [4, 46, 80–82]. Каталитическое восстановление Tug* в цитохроме a приводит к состоянию P_R и должно обеспечить энергию для перемещения одного протона внутри белка к так называемой протонной ловушке или месту загрузки протонов [4, 83]. Можно предположить, что в отсутствие внешних доноров электронов, способность CсO перекачивать H^+ за счет восстановления радикалов может быть утрачена через несколько минут после образования P_M . Эта потеря может быть следствием нефизиологического редокс-пути, который используется для аннигиляции радикалов Tug.

В целом это исследование показало, как с помощью абсорбционной спектроскопии UV-Vis, так и с помощью изотермической титрационной калориметрии, что переход окисленной бычьей цитохром c -оксидазы в феррильное состояние P_M с помощью H_2O_2 сопровождается выделением большого количества тепла (-32 ккал/моль фер-

рильного состояния). Это составляет ~64% общего изменения ΔH , наблюдаемого при каталитическом восстановлении молекулы O_2 четырьмя ферроцитохромами *c*. Избыток выделенного тепла означает, что во время генерации формы P_M также протекают какие-то другие побочные реакции. На основании наших и других опубликованных данных, реакцию окисленной CcO с H_2O_2 можно обобщить следующей схемой (E):



где действительно образуются два феррильных состояния P -типа, P_M и P_R , для которых характерны идентичные спектры в видимой области спектра. Сначала H_2O_2 вызывает образование феррильного железа и радикала в каталитическом центре (P_M). Однако в то время, когда эта форма окисленного железа P -типа спектрально полностью развита, радикал уже мигрировал из каталитического центра и сформировалось состояние P_R . Эта миграция радикала и его вероятное тушение — очевидно, побочные реакции,

которые вносят вклад в наблюдаемое изменение энтальпии в ходе реакции окисленной CcO с H_2O_2 .

Благодарности. Эта работа посвящается памяти А.А. Константинова, выдающегося ученого, вдохновляющего коллегу и дорогого друга.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена в рамках проекта «Открытое научное сообщество для проведения современных междисциплинарных исследований в медицине» («Open scientific community for modern interdisciplinary research in medicine (OPENMED)-ITMS2014+: 313011V455»), проводимого Operational Program Integrated Infrastructure и финансируемого ERDF и Грантовым Агентством Словакии (Slovak Grant Agency) (VEGA 1/0464/18).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо иной сфере.

Соблюдение этических норм. В настоящей работе нет описания работ, выполненных авторами статьи и проведенных с участием людей или использованием в качестве объектов исследования лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. A (2001) Novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1505**, 185-208.
- Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., et al. (2012) The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 629-637.
- Wikstrom, M. K. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273.
- Wikstrom, M., Krab, K., and Sharma, V. (2018) Oxygen activation and energy conservation by cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **118**, 2469-2490.
- Kim, Y. C., Wikstrom, M., Hummer, G. (2007) Kinetic models of redox-coupled proton pumping, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2169-2174.
- Rauhamaeki, V., and Wikstrom, M. (2014) The causes of reduced proton-pumping efficiency in type B and C respiratory heme-copper oxidases, and in some mutated variants of type A, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1837**, 999-1003.
- Han, H., Hemp, J., Pace, L. A., Ouyang, H., Ganesan, K., et al. (2011) Adaptation of aerobic respiration to low O_2 environments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14109-14114.
- Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., and Millett, F. (1993) Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome *c* derivatives and cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **32**, 8492-8498.
- Szundi, I., Cappuccio, J. A., Borovok, N., Kotlyar, A. B., and Einarsdottir, O. (2001) Photoinduced electron transfer in the cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase complex using thiouredoxypyrrenetrisulfonate-labeled cytochrome *c* optical multichannel detection, *Biochemistry*, **40**, 2186-2193.
- Geren, L., Durham, B., and Millett, F. (2009) Use of ruthenium photoreduction techniques to study electron transfer in cytochrome oxidase, *Method Enzymol.*, **456**, 507-520.
- Wikstrom, M. (2012) Active site intermediates in the reduction of O_2 by cytochrome oxidase, and their derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 468-475.
- Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion, *FEBS Lett.*, **586**, 630-639.
- Wikstrom, M. (1981) Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 4051-4054.
- Wikstrom, M., and Morgan, J. E. (1992) The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10266-10273.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock, G. T. (1998) Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8020-8025.
- Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B., and Palmer, G. (1999) Mass spectrometric determination of dioxygen bond splitting in the "peroxy" intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13114-13117.
- Pinakoulaki, E., Daskalakis, V., Ohta, T., Richter, O. M., Budiman, K., et al. (2013) The protein effect in the structure of two ferryl-oxo intermediates at the same oxidation level in the heme copper binuclear center of cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, **288**, 20261-20266.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock, G. T. (2000) Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, **290**, 1588-1591.
- Gorbikova, E. A., Belevich, I., Wikstrom, M., and Verkhovskiy, M. I. (2008) The proton donor for OO bond

- scission by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 10733-10737.
20. Morgan, J. E., Verkhovskiy, M. I., and Wikstrom, M. (1996) Observation and assignment of peroxy and ferryl intermediates in the reduction of dioxygen to water by cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **35**, 12235-12240.
 21. Björck, M. L., and Brzezinski, P. (2018) Control of transmembrane charge transfer in cytochrome *c* oxidase by the membrane potential, *Nat. Commun.*, **9**, 1-8.
 22. Einarsdóttir, O., Szundi, I., Van Eps, N., and Sucheta, A. (2002) P_M and P_R forms of cytochrome *c* oxidase have different spectral properties, *J. Inorg. Biochem.*, **91**, 87-93.
 23. Belevich, I., Verkhovskiy, M. I., and Wikstrom, M. (2006) Proton-coupled electron transfer drives the proton pump of cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **440**, 829-832.
 24. Faxen, K., Gilderson, G., Ådelroth, P., and Brzezinski, P. A. (2005) Mechanistic principle for proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **437**, 286-289.
 25. Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovskiy, M. I., and Wikstrom, M. (2004) The catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase is not the sum of its two halves, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **101**, 529-533.
 26. Verkhovskiy, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E., and Wikstrom, M. (1999) Proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **400**, 480-483.
 27. Szundi, I., Funatogawa, C., Soulimane, T., and Einarsdóttir, O. (2020) The reactions of O₂ and NO with mixed-valence ba₃ cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biophys. J.*, **118**, 386-395.
 28. Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikström, M., et al. (2007) Time-resolved single-turnover of ba₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383-1392.
 29. Smirnova, I. A., Zaslavsky, D., Fee, J. A., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2008) Electron and proton transfer in the ba₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, *J. Bioenerg. Biomem.*, **40**, 281-287.
 30. Poiana, F., von Ballmoos, C., Gonska, N., Blomberg, M. R. A., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2017) Splitting of the O–O bond at the heme-copper catalytic site of respiratory oxidases, *Sci. Adv.*, **3**, e1700279.
 31. Blomberg, M. R. A. (2020) The mechanism for oxygen reduction in the C family cbb3 cytochrome *c* oxidases – implications for the proton pumping stoichiometry, *J. Inorg. Biochem.*, **203**, 11086.
 32. Paulus, A., Rossius, S. G. H., Dijk, M., and de Vries, S. (2012) Oxoferryl-porphyrin radical catalytic intermediate in cytochrome *bd* oxidases protects cells from formation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830-8838.
 33. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509.
 34. Borisov, V. B., and Siletsky, S. A. (2019) Features of organization and mechanism of catalysis of two families of terminal oxidases: heme-copper and *bd*-type, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1390-1402.
 35. Soulimane, T., and Buse, G. (1995) Integral cytochrome-*c*-oxidase – preparation and progress towards a 3-dimensional crystallization, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 588-595.
 36. Liao, G. L., and Palmer, G. (1996) The reduced minus oxidized difference spectra of cytochromes *a* and *a*(3), *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1274**, 109-111.
 37. 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.
 38. Fabian, M., and Palmer, G. (1995) The interaction of cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relationship of compounds P and F, *Biochemistry*, **34**, 13802-13810.
 39. Bergmayer, H. U., Gawehn, K., and Grassl, M. (1970) *Methoden der Enzymatischen Analyse* (Bergmayer, H. U., ed.), 1, 440.
 40. Kopcova, K., Mikulova, L., Pechova, I., Sztachova, T., Cizmar, E., et al. (2020) Modulation of the electron-proton coupling at cytochrome *a* by the ligation of the oxidized catalytic center in bovine cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1861**, 148237.
 41. Morin, P. E., and Freire, E. (1991) Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **30**, 8494-8500.
 42. Junemann, S., Heathcote, P., and Rich, P. R. (2000) The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1456**, 56-66.
 43. Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome *c* oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853-4861.
 44. Yu, M. A., Egawa, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Guallar, V., et al. (2012) Two tyrosyl radicals stabilize high oxidation states in cytochrome *c* oxidase for efficient energy conservation and proton translocation, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 4753-4761.
 45. Shimada, A., Etoh, Y., Kitoh-Fujisawa, R., Sasaki, A., Shinzawa-Itoh, K., et al. (2020) X-ray structures of catalytic intermediates of cytochrome *c* oxidase provide insights into its O₂ activation and unidirectional proton-pump mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **295**, 5818-5833.
 46. Kaila, V. R., Verkhovskiy, M. I., and Wikstrom, M. (2010) Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase, *Chem. Rev.*, **110**, 7062-7081.
 47. Jancura, D., Stanicova, J., Palmer, G., and Fabin, M. (2014) How hydrogen peroxide is metabolized by oxidized cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **53**, 3564-3575.
 48. Chen, Y. R., Gunther, M. R., and Mason, R. P. (1999) An electron spin resonance spin-trapping investigation of the free radicals formed by the reaction of mitochondrial cytochrome *c* oxidase with H₂O₂, *J. Biol. Chem.*, **274**, 3308-3314.
 49. Weng, L. C., and Baker, G. M. (1991) Reaction of hydrogen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase, *Biochemistry*, **30**, 5727-5733.
 50. Brittain, T., Little, R. H., Greenwood, C., and Watmough, N. J. (1996) The reaction of *Escherichia coli* cytochrome *bo* with H₂O₂: evidence for the formation of an oxoferryl species by two distinct routes, *FEBS Lett.*, **399**, 21-25.
 51. 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.
 52. Ksenzenko, M., 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.
 53. Luo, Y.-R. (2007) *Comprehensive Handbook of Chemical Bond Energies*, CRC Press, Boca Raton.
 54. Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., Babcock, G. T., and Wikstrom, M. (2000) Modeling cytochrome oxidase: a quantum chemical study of the O–O bond cleavage mechanism, *J. Am. Chem. Soc.*, **122**, 12848-12858.
 55. Blomberg, M. R., Siegbahn, P. E., and Wikstrom, M. (2003) Metal-bridging mechanism for O–O bond cleavage in cytochrome *c* oxidase, *Inorg. Chem.*, **42**, 5231-5243.
 56. Blomberg, M. R. A. (2019) Active site midpoint potentials in different cytochrome *c* oxidase families: a computational comparison, *Biochemistry*, **58**, 2028-2038.
 57. Khan, K. K., Mondal, M. S., Padhy, L., and Mitra, S. (1998) The role of distal histidine in peroxidase activity of myoglobin—transient-kinetics study of the reaction of H₂O₂ with wild-type and distal-histidine-mutated recombinant human myoglobin, *Eur. J. Biochem.*, **257**, 547-555.
 58. Mondal, M. S., and Mitra, S. (1996) Kinetic studies of the two-step reactions of H₂O₂ with manganese-reconstituted myoglobin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 174-180.
 59. Baek, H. K., and Van Wart, H. E. (1989) Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum, *Biochemistry*, **28**, 5714-5719.
 60. Khan, K. K., Mondal, M. S., and Mitra, S. (1996) Kinetic

- studies of the reaction of hydrogen peroxide with manganese-reconstituted horseradish peroxidase, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1059-1062.
61. Rigby, S. E., Junemann, S., Rich, P. R., and Heathcote, P. (2000) Reaction of bovine cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide produces a tryptophan cation radical and a porphyrin cation radical, *Biochemistry*, **39**, 5921-5928.
 62. Budiman, K., Kannt, A., Lyubenova, S., Richter, O. M., Ludwig, B., et al. (2004) Tyrosine 167: the origin of the radical species observed in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide in *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **43**, 11709-11716.
 63. MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T., and Michel, H. (1999) Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **38**, 9179-9184.
 64. Rich, P. R., Rigby, S. E., and Heathcote, P. (2002) Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 137-146.
 65. Musatov, A., Hebert, E., Carroll, C. A., Weintraub, S. T., and Robinson, N. C. (2004) Specific modification of two tryptophans within the nuclear-encoded subunits of bovine cytochrome *c* oxidase by hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **43**, 1003-1009.
 66. Musatov, A., and Robinson, N. C. (2012) Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome *c* oxidase, *Free Radic. Res.*, **46**, 1313-1326.
 67. Lemma-Gray, P., Weintraub, S. T., Carroll, C. A., Musatov, A., and Robinson, N. C. (2007) Tryptophan 334 oxidation in bovine cytochrome *c* oxidase subunit I involves free radical migration, *FEBS Lett.*, **581**, 437-442.
 68. Fabian, M., and Palmer, G. (1999) Redox state of peroxy and ferryl intermediates in cytochrome *c* oxidase catalysis, *Biochemistry*, **38**, 6270-6275.
 69. King, N. K., and Winfield, M. E. (1963) The mechanism of metmyoglobin oxidation, *J. Biol. Chem.*, **238**, 1520-1528.
 70. Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P. R. (1992) Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H₂O₂, *J. Biol. Chem.*, **267**, 8827-8833.
 71. Tew, D., and Ortiz de Montellano, P. R. (1988) The myoglobin protein radical. Coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H₂O₂-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin, *J. Biol. Chem.*, **263**, 17880-17886.
 72. Witting, P. K., Douglas, D. J., and Mauk, A. G. (2000) Reaction of human myoglobin and H₂O₂. Involvement of a thiyl radical produced at cysteine 110, *J. Biol. Chem.*, **275**, 20391-20398.
 73. Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Cooper, C. E., and Wilson, M. T. (2004) The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, **6**, 954-966.
 74. Svistunenko, D. A., Dunne, J., Fryer, M., Nicholls, P., Reeder, B. J., et al. (2002) Comparative study of tyrosine radicals in hemoglobin and myoglobins treated with hydrogen peroxide, *Biophys. J.*, **83**, 2845-2855.
 75. Svistunenko, D. A. (2001) An EPR study of the peroxy radicals induced by hydrogen peroxide in the haem proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**, 365-378.
 76. Erman, J. E., and Yonetani, T. (1975) A kinetic study of the endogenous reduction of the oxidized sites in the primary cytochrome *c* peroxidase-hydrogen peroxide compound, *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 350-357.
 77. Hiner, A. N., Martinez, J. I., Arnao, M. B., Acosta, M., Turner, D. D., et al. (2001) Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3091-3098.
 78. Miller, V. P., Goodin, D. B., Friedman, A. E., Hartmann, C., and Ortiz de Montellano, P. R. (1995) Horseradish peroxidase Phe172→Tyr mutant. Sequential formation of compound I with a porphyrin radical cation and a protein radical, *J. Biol. Chem.*, **270**, 18413-18419.
 79. Wu, G., Rogge, C. E., Wang, J. S., Kulmacz, R. J., Palmer, G., and Tsai, A. L. (2007) Oxyferryl heme and not tyrosyl radical is the likely culprit in prostaglandin H synthase-1 peroxidase inactivation, *Biochemistry*, **46**, 534-542.
 80. Blomberg, M. R. A., and Siegbahn, P. E. M. (2014) Proton pumping in cytochrome *c* oxidase: energetic requirements and the role of two proton channels, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1165-1177.
 81. Sharpe, M. A., and Ferguson-Miller, S. (2008) A chemically explicit model for the mechanism of proton pumping in heme-copper oxidases, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 541-549.
 82. Brzezinski, P., and Gennis, R. B. (2008) Cytochrome *c* oxidase: exciting progress and remaining mysteries, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 521-531.
 83. Rich, P. R. (2017) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 813-829.

THERMODYNAMICS OF THE P-TYPE FERRYL FORM OF BOVIN CYTOCHROME *c* OXIDASE

L. Mikulova¹, I. Pechova², D. Jancura², M. Stupak³, and M. Fabian^{1*}

¹ Center for Interdisciplinary Biosciences, Technology and Innovation Park, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic; E-mail: marian.fabian@upjs.sk

² Department of Biophysics, Faculty of Science, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic

³ Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, 04011 Košice, Slovak Republic

Several ferryl states of the catalytic heme a_3 -Cu_B center of the respiratory cytochrome *c* oxidases (CcOs) are observed during the reduction of O₂ to H₂O. One of the P-type ferryl forms, P_M, is produced by the reaction of the two-electron reduced CcO with O₂. In this state, the heme a_3 iron is in the ferryl state and a free radical should be also present at the catalytic center. However, the energetics of the P_M formation has not been experimentally established yet. Here, the generation of P_M by the reaction of oxidized bovine CcO (O) with one molecule of H₂O₂ was investigated by the isothermal titration calorimetry and UV-Vis absorption spectroscopy. Two kinetic phases, corresponding to the formation of P_M and its endogenous conversion back to O, were resolved by both methods. The ΔH of the entire process (-66 kcal/mol H₂O₂) was larger than the heat (-50.8 kcal/mol O₂) liberated during O₂ reduction by ferrocycytochrome *c* (pH 8, 25°C). Interestingly, ΔH of the first phase (-32 kcal/mol ferryl state) far exceeds the enthalpy of the P_M production. The data indicate that during the first phase, the radical in P_M is quenched and spectrally similar second P-type ferryl form (P_R) is produced. Additionally, it was shown that the entropy contribution to the Gibbs energy change (ΔG = -46 kcal/mol O₂) during the catalytic reduction of O₂ by ferrocycytochrome *c* is negligible (-0.7 cal·mol⁻¹·K⁻¹).

Keywords: cytochrome *c* oxidase, hydrogen peroxide, ferryl state, isothermal titration calorimetry