

УДК 576.311; 571.27

ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ПЕРЕХОДА F→O ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗЫ. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Zn²⁺ НА ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ СТОРОНЕ МЕМБРАНЫ

© 2021 С.А. Силецкий^{1*}, Р.Б. Геннис²

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: siletsky@belozersky.msu.ru

² Университет Иллинойса, факультет биохимии, Урбана-Шампэйн, 61801 Иллинойс, США

Поступила в редакцию 05.10.2020

После доработки 12.12.2020

Принята к публикации 12.12.2020

Влияние ионов Zn²⁺ на Р-сторону протеолипосом, содержащих встроенную в мембрану цитохром *c*-оксидазу из *Rhodobacter sphaeroides*, было изучено с помощью метода электрометрии с временным разрешением при введении одного электрона в фермент, переведенный предварительно в состояние F. Вместе с ферментом дикого типа также были изучены две его мутантные формы: N139D и D132N. Все полученные данные свидетельствуют о том, что первичное влияние Zn²⁺, добавленного на Р-сторону мембраны, заключается в ингибировании скорости высвобождения перекачиваемого протона из сайта загрузки протонов (PLS) в объемную водную фазу на Р-стороне мембраны. Эти результаты позволяют определенно говорить о том, что есть два пути, по которым перекачиваемый протон может покинуть белок из PLS, а также то, что есть два отдельных сайта связывания ионов Zn²⁺. Представлена модель, объясняющая влияние Zn²⁺ на кинетику образования мембранного потенциала COX дикого типа, а также её мутантных форм N139D и D132N.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *c*-оксидаза, ионы цинка, протеолипосомы, электрогенный, протонный насос, цитохром *aa*₃, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972521010103

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *c*-оксидаза (COX) является редокс-зависимым протонным насосом, который трансформирует энергию высоко экзергонического процесса восстановления молекулярного кислорода до молекулы воды в генерацию трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов, обозначаемую Δμ_{H⁺} [1–3]. Этот фермент имеет четыре редокс-центра, содержащих металлы. Два входных центра (Cu_A и гем *a*) переносят электроны от природного донора (цитохром *c*) на конечный каталитический сайт, где кислород восстанавливается до воды. Сайт восстановления кислорода распо-

ложен глубоко в гидрофобном ядре белка и образуется при участии высокоспинового иона железа гема *a*₃ и иона меди, Cu_B.

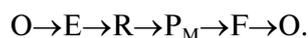
Механизм генерации Δμ_{H⁺} цитохром *c*-оксидазой включает электрогенный перенос электронов и «химических» протонов в биядерный центр гем *a*₃/Cu_B с противоположных сторон мембраны, приводя в итоге к образованию воды из молекулярного кислорода. Кроме поглощения химических протонов, один протон дополнительно перекачивается через мембрану на каждый электрон, перенесенный цитохром *c*-оксидазой от цитохрома *c* на молекулярный кислород [4].

С помощью метода рентгеновской кристаллографии были получены трехмерные кристаллические структуры четырех представителей семейства А цитохром *c*-оксидаз [5–7], в которых были выявлены 3 предполагаемых протон-проводящих пути (К-, D- и Н-каналы) для переноса протонов из внутренней водной фазы в ходе каталитического цикла. Работы с бактериальными оксидазами в значительной степени были облегчены возможностью получения мутантных форм фермента с нарушенной активностью [8–11].

Принятые сокращения: BNC – биядерный центр; COX – цитохром *c*-оксидаза (cytochrome *c* oxidase); Δψ – изменение трансмембранного потенциала; F, O и P – состояния цитохром *c*-оксидазы (states of cytochrome *c* oxidase); P- и N-фазы – положительно и отрицательно заряженные водные фазы, разделенные сопрягающей мембраной; PLS – сайт загрузки протонов (proton loading site); Rubpy – Tris-бипиридиновый комплекс рутения (Tris-bipyridyl complex of ruthenium (II)); WT – COX дикого типа.

* Адресат для корреспонденции.

Каталитический цикл COX можно описать в виде четырех одноэлектронных переносов от цитохрома *c* на биядерный центр, приводящих к восстановлению O₂ до H₂O. Каждый из этих четырех одноэлектронных этапов сопряжен с перекачкой одного протона через мембрану. Каталитический цикл начинается с окисленной формы фермента (состояние O). Последовательное добавление электронов в присутствии молекулярного кислорода приводит к образованию серии промежуточных состояний фермента, обозначаемых как состояния E, R, P_M и F:



После восстановления фермента двумя электронами с образованием восстановленного одним электроном (состояния E) и двумя электронами (состояния R) происходит связывание молекулы O₂ и затем расщепление связи O—O с образованием состояния P_M, в котором один атом кислорода связан с феррильной (Fe⁴⁺) формой гема *a*₃, а второй атом кислорода связан с Cu_B в виде гидроксильной группы (OH⁻). Для расщепления связи O—O необходимы 4 электрона. Два необходимых дополнительных электрона обеспечиваются ионом Fe³⁺ гема *a*₃, переходящим в гипервалентное состояние Fe⁴⁺, и редокс-активным модифицированным остатком тирозина в активном центре [12]. Переносы электронов при переходах P_M→F и F→O, по существу, приводят к восстановлению двух электронов, «заимствованных» для расщепления связи O—O. Можно предварительно перевести COX в состояния P_M и F и затем изучать переходы P_M→F и F→O в виде изолированных одноэлектронных переходов с использованием Tris-бипиридинового комплекса рутения (Ru(bpy)₃) как фотоактивируемого одноэлектронного восстановителя [13].

За изменениями трансмембранного потенциала, ΔΨ, в результате фотоинъекции одного электрона в состояния P_M и F, можно наблюдать с использованием электрометрических методов. Такие эксперименты привели к выявлению нескольких фаз с временным разрешением процесса генерации напряжения при переходах P_M→F и F→O в случае COX из клеток млекопитающих (из сердца быка), а также COX *aa*₃ из бактериальных источников, таких как *Paracoccus denitrificans* и *Rhodobacter sphaeroides* [2, 13–14]. Эти фазы включают быстрые (микросекундные) компоненты, которые не чувствительны к присутствию KCN, блокирующему реакции с участием кислорода в биядерном центре гем *a*₃/Cu_B (BNC), и следующие за ними более медленные (миллисекундные) компоненты, которые

не обнаруживаются в присутствии KCN. Ион цианида (CN⁻) связывается с BNC.

На многие вопросы, касающиеся механизма действия COX, до сих пор нет ответов. В настоящей работе нами было использовано преимущество, которое дает ингибирование активности COX при добавлении Zn²⁺ на электрически положительную сторону мембраны, и мониторинг перехода F→O с использованием электрометрических методов. Ингибиторы часто являются полезными инструментами для изучения механизма действия ферментов. Большинство ингибиторов COX направлены на BNC (активный центр фермента) или входные сайты протон-проводящих каналов на N-стороне мембраны. Есть несколько ингибиторов, которые оказывают воздействие на P-сторону мембраны. Кроме Zn²⁺, изученного в настоящей работе, закоренные на мембране пептиды, возможно, также могут ингибировать фермент с P-стороны мембраны [15].

Помимо того, что Zn²⁺ является полезным лабораторным инструментом, высокие концентрации Zn²⁺ вызывают гибель нервных клеток [16]. Также было показано присутствие Zn²⁺ в межмембранном пространстве митохондрий [17]. Когда цитозоль клетки перегружен Zn²⁺, его можно изолировать в межмембранном пространстве митохондрий [17] — месте, которое крайне важно для реакций окислительного фосфорилирования. Свободные радикалы, образующиеся в виде токсичных побочных продуктов, могут способствовать высвобождению Zn²⁺ из металлотионеина, приводя к повышению концентрации свободных ионов Zn²⁺ в межмембранном пространстве по сравнению с цитозолем [17]. Высокие концентрации Zn²⁺ ингибируют образование энергии в клетке. Мишенью действия Zn²⁺ в гликолизе является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [18], а в цикле трикарбоновых кислот ионы Zn²⁺ нацелены на α-кетоглутаратдегидрогеназу [19]. В дыхательной цепи Zn²⁺ оказывает воздействие на основные генераторы протондвижущей силы путем ингибирования восстановления и протонирования хинона и/или транслокации протонов в митохондриальных комплексах I и III [20–21], ингибирует активность NADH-дегидрогеназы в клетках *Escherichia coli* [22], митохондриальной COX и бактериальных цитохромоксидаз *aa*₃- и *cbb*₃-типа [23–25].

Влияние Zn²⁺ на активность COX было исследовано в нескольких лабораториях. Aagaard и Brzezinski [26] изучили влияние Zn²⁺ на солиобилизованную детергентами COX *aa*₃ из *R. sphaeroides* с помощью метода «флоу-флэш». Было показано, что Zn²⁺ ингибирует как пере-

ход $P_R \rightarrow F$, так и переход $F \rightarrow O$ в ходе одного оборота фермента после добавления O_2 к полностью восстановленному ферменту. Было предположено, что сайты связывания Zn^{2+} располагаются на входе в протонный D-канал на N-стороне COX, и это затем было подтверждено структурными данными [27].

Также было проведено изучение COX, включенной в протеолипосомы, содержащие Zn^{2+} на внутренней (N-стороне) мембраны [28]. Присутствие Zn^{2+} на N-стороне COX приводило к снижению стехиометрии перекачивания протона (на электрон) и замедлению скоростей стадий переноса зарядов, относимых к переносу протонов через D- и K-каналы. В этих работах было проведено изучение влияния Zn^{2+} в условиях стационарных измерений оборотов фермента и во время перехода $F \rightarrow O$ с временным разрешением. В целом, результаты, полученные Aagaard и Brzezinski [26], соответствуют результатам Kannt et al. [28].

Влияние Zn^{2+} , добавленного на P-сторону COX, было впервые изучено на митохондриях [29] и затем на COX из *R. sphaeroides*, включенных в протеолипосомы [23]. В обоих случаях стационарная активность COX ингибировалась Zn^{2+} , добавленным к внешней стороне мембраны (P-сторона), и только при наличии трансмембранной $\Delta\Psi$. Было показано, что в присутствии разобщителей, которые разрушают протондвижущую силу, Zn^{2+} , добавленный с P-стороны, не вызывает ингибирование фермента. Однако было обнаружено, что добавление Zn^{2+} на P-сторону бычьей COX, реконструированной в протеолипосомах в присутствии разобщителей, приводит к значительному ингибированию, но при этом фермент должен совершать обороты в присутствии восстановителя, и ингибирование ионами Zn^{2+} при этом может происходить в течение многих минут или часов [24]. Было предположено, что данное ингибирование может быть связано с замедлением скорость-лимитирующего перехода $F \rightarrow O$ каталитического цикла, и для него не требуется трансмембранной $\Delta\Psi$. Предположительно, сайт связывания Zn^{2+} на P-стороне не доступен в окисленном состоянии фермента, но становится доступным для катиона в некоторых частично восстановленных состояниях оксидазы. Было предположено, что это может быть связано с восстановлением Cu_B [30].

С использованием метода флуо-флэш [31] было показано, что Zn^{2+} , добавленный к P-сторону COX из *R. sphaeroides*, реконструированной в липосомах, не вызывает изменений скоростей внутренних реакций переноса электронов, но при этом он избирательно нарушает процесс

высвобождения протона только во время перехода $P_R \rightarrow F$ и не оказывает действия при переходе $F \rightarrow O$. Однако условия метода флуо-флэш не воспроизводят условия присутствия слабого восстановителя или влияние $\Delta\Psi$, которые наиболее тесно связаны с естественными условиями внутри митохондрий. В настоящей работе с использованием фотовведения одного электрона с помощью Rubpr в COX из *R. sphaeroides*, реконструированной в протеолипосомах, было проведено детальное изучение того, как связывание Zn^{2+} с P-стороной COX изменяет электрогенные стадии во время перехода $F \rightarrow O$. В отличие от работ с использованием метода флуо-флэш [31], полученные нами результаты показывают, что связывание Zn^{2+} с P-стороной COX приводит к ингибированию высвобождения протонов во время перехода $F \rightarrow O$.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение фермента. COX aa_3 была выделена из мембран клеток *R. sphaeroides*, как было описано ранее [32].

Включение COX в состав протеолипосом. Везикулы, содержащие COX (COVs), получали с помощью стандартного метода диализа холата, который ранее был использован при работе с COX быка [33], цитохром ba_3 -оксидазой из *Thermus thermophilus* [34] и aa_3 -оксидазой из *R. sphaeroides* [9]. Очищенный препарат азолектина в концентрации 40 мг/мл суспендировали в 75 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, содержащем 2% холата, раствор озвучивали до достижения его прозрачности. Солюбилизованную цитохром-оксидазу инкубировали во льду в 75 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, содержащем 2% холата, в течение 1 ч, затем смешивали с озвученным азолектином с конечной концентрацией 4 мкМ оксидазы и 40 мг/мл липида.

Спектрофотометрические измерения с временным разрешением при проведении экспериментов по фотовосстановлению. Фотоиндуцированные разрешенные во времени изменения величины оптического поглощения измеряли с помощью однолучевого спектрофотометра с микросекундным временным разрешением. Подробности таких измерений были ранее опубликованы [9, 35–39]. Реакция запускалась вспышкой, направленной от лазера («Spectra Physics», США) с удвоенной частотой (frequency-doubled neodymium YAG laser; Lab-170-10; $\lambda = 532$ нм; 9 нс; 200–300 мДж). Образец помещали в прямоугольную полумикроювету с длиной оптического пути 4 мм («Starna Cells», США). Сигнал фотомножителя был оцифрован с помощью кар-

ты PC-installed Gage 8012A card («GaGe», США) (временная шкала — 2 000 000 точек с запрограммированным распределением; шкала по оси ординат — 12 бит). 15–30 кривых, снятых через каждые 3–5 с, были усреднены для каждой кривой поглощения.

Регистрация образования электрического потенциала с временным разрешением. Генерация разности электрических потенциалов на мембране везикул регистрировалась методом электрометрии [40], адаптированным для проведения экспериментов с СОХ с временным разрешением [41–42]. Подробности приготовления образцов и использованного метода были приведены в предыдущих статьях [9, 33, 43–44].

Анализ полученных данных. Экспериментальные кинетические кривые были обработаны с помощью программ Origin 7 («OriginLab Corporation», США), PLUK [45], MATLAB («Mathworks», США). Характеристические значения времен и относительные величины (амплитуды) электрогенных стадий были получены разложением электрометрических кривых на индивидуальные экспоненты, как это было сделано ранее при изучении фотоэлектрических ответов цитохромоксидазы и других электрогенных белков [33–34, 46–49]. Если электрогенные фазы обладают близкими значениями констант скорости и ассоциированы с последовательными, а не с параллельными процессами, то истинные амплитуды фаз могут сильно различаться в зависимости от того, какая кинетическая модель была использована [50]. Исходя из этого, относительные величины промежуточных и медленных электрогенных протонных фаз были пересчитаны, согласно последовательной модели [13, 51].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние Zn^{2+} на индуцированную светом быструю кинетику образования мембранного потенциала цитохром *c*-оксидазой дикого типа из *R. sphaeroides* (WT). На рис. 1 представлен индуцированный светом электрогенный ответ с временным разрешением, полученный в результате измерения событий переноса заряда, сопряженных с переходом F→O цитохром *c*-оксидазы из *R. sphaeroides*. Перед введением электрона СОХ была переведена в состояние F путем обработки перекисью водорода встроенного в липосому окисленного фермента, как это было описано ранее [52]. В результате были разделены во времени четыре основных электрогенных процесса, что соответствовало предыдущим результатам [11]: две быстрые фазы в микросекундной

временной шкале (примерно 10 и 31 мкс), промежуточная фаза (~0,49 мс) и медленная фаза (~1,53 мс). Их относительные амплитуды представлены в табл. 1 и хорошо согласуются с предыдущими измерениями [9, 11]. Микросекундные компоненты этого ответа нечувствительны к действию KCN. Первая быстрая фаза ассоциирована с переносом электрона от Cu_A на гем *a*; минорная, 2-я быстрая фаза, связана с переносом положительного заряда или протона (изнутри наружу), добавляя электрогенность стадии переноса электрона.

Более медленные миллисекундные фазы (~0,4 и ~1,5 мс) фотоэлектрического ответа чувствительны к KCN и находятся в зависимости от функционального состояния D-канала входа протонов [8]. Эти фазы регистрируют движение как перекачиваемых, так и химических протонов через фермент.

На рис. 1 наглядно показано, что добавление Zn^{2+} в раствор (P-сторона СОХ) приводит к замедлению миллисекундных составляющих фотоэлектрического ответа, но не влияет на его микросекундную составляющую. Качественно сходные результаты были получены ранее при изучении СОХ из митохондрий быка [24]. Эффект добавления Zn^{2+} носит обратимый характер, что было показано в экспериментах с добавлением ЭДТА (рис. 1, а), где обеспечивается изоляция Zn^{2+} из раствора и восстанавливается фотоэлектрический ответ до такой степени, которая наблюдается в отсутствие Zn^{2+} .

На рис. 1, б показано, что если вместо Zn^{2+} добавить Ni^{2+} , то изменений в фотоэлектрическом ответе не наблюдается. Это согласуется с сообщениями Mills et al. [23] о том, что ингибирование двухвалентными металлами, добавляемыми на P-сторону, специфично для ионов Zn^{2+} , что контрастирует с ингибированием, когда двухвалентные металлы добавляются на N-сторону СОХ. Ni^{2+} , Cd^{2+} и другие ионы оказывают такой же ингибирующий эффект, как и Zn^{2+} . Следовательно, эти данные определенно говорят о том, что ингибирующее действие Zn^{2+} , о котором говорится в настоящей работе, не связано с его проникновением через липосомную мембрану и связыванием с D-протонным каналом с N-стороны.

В табл. 1 и на рис. 2 представлен мультиэкспоненциальный анализ электрогенного ответа в присутствии ионов цинка. Полученные экспериментальные данные были проанализированы с использованием 5-экспоненциальной (рис. 2, а) и 4-экспоненциальной аппроксимации (рис. 2, б). Графики остаточных величин в каждом случае показывают, что использование пяти экспонент оправдано для анализа кинетических кривых.

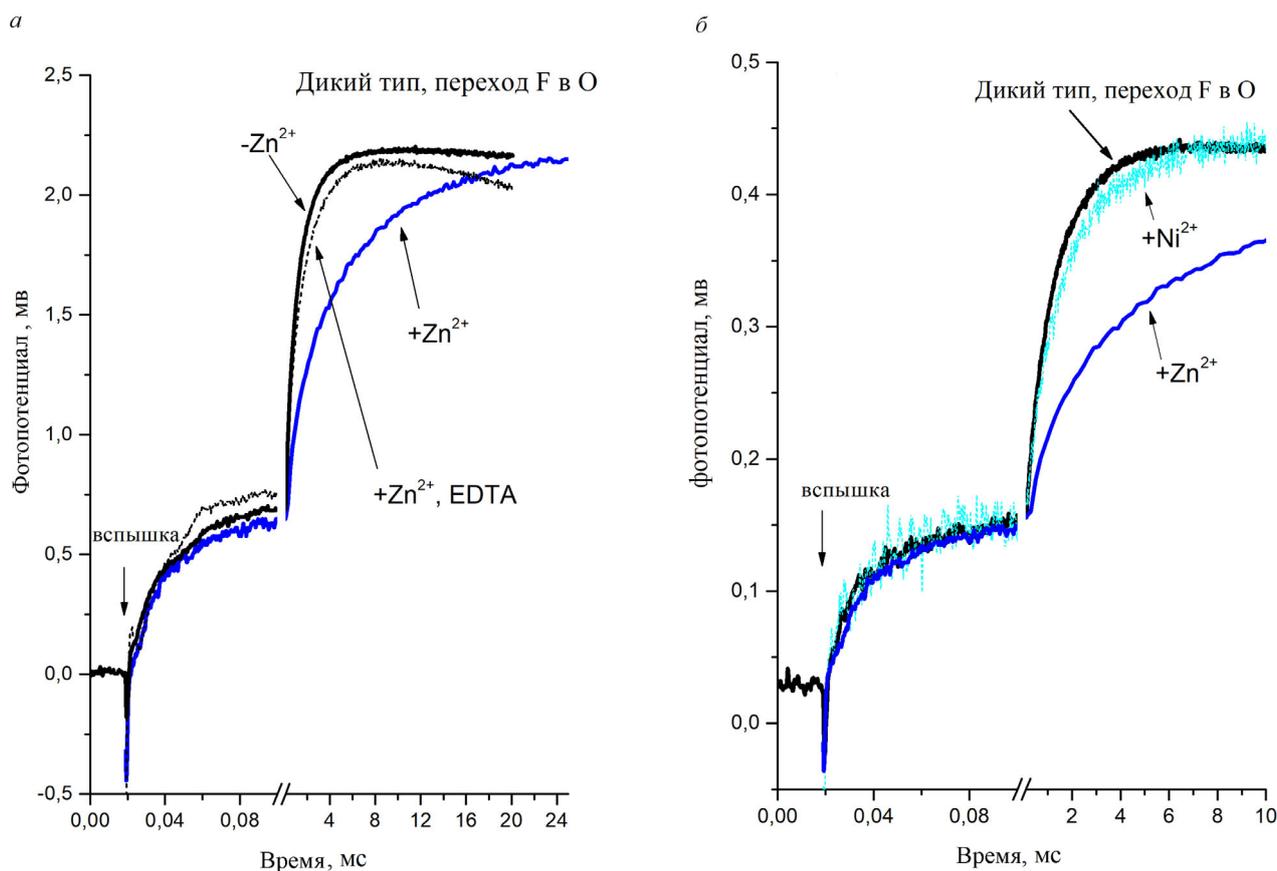


Рис. 1. Влияние добавления Zn^{2+} на кинетику образования мембранного потенциала цитохром *c*-оксидазой из *R. sphaeroides*. *a* – СОХ дикого типа после добавления Zn^{2+} и после добавления EDTA. *б* – Те же условия, что в панели (*a*), но при этом вместо Zn^{2+} был добавлен Ni^{2+} . Для сравнения, также показана кинетика из рис. 1, *a*, полученная после добавления Zn^{2+} , и она нормализована относительно полного значения. Условия: 5 мМ Tris-ацетат, рН 8,0, 10 мМ анилин, 40 мкМ Rubpru, 4 мМ H_2O_2 (40 мкМ Zn^{2+} , 100 мкМ Ni^{2+} и 0,2 мМ ЭДТА были добавлены, если указано)

Константы времени и относительные амплитуды фаз представлены в табл. 1, в которой также есть результаты, полученные ранее [8, 9, 11] для кинетики генерации потенциала в отсутствие Zn^{2+} . В отсутствие Zn^{2+} данные хорошо описываются 4-экспоненциальной аппроксимацией. Полученные результаты говорят о том, что при-

сутствие Zn^{2+} приводит к дополнительной медленной миллисекундной фазе, которая не наблюдается в отсутствие ингибитора.

Как показано в табл. 1, основное влияние 40 мкМ Zn^{2+} и 320 мкМ Zn^{2+} оказывается на медленную фазу, которая разбивается на два компонента, «медленная-1» и «медленная-2».

Таблица 1. Кинетические фазы, наблюдаемые с использованием электрометрических методов, после фотоинъекции электрона для запуска перехода F→O в реконструированной в протеолипосомах СОХ дикого типа (WT) из *R. sphaeroides* при отсутствии Zn^{2+} , в присутствии 40 мкМ Zn^{2+} и в присутствии 320 мкМ Zn^{2+}

WT			WT + 40 мкМ Zn^{2+}			WT + 320 мкМ Zn^{2+}		
Фаза	τ , мс	Амплитуда, %	Фаза	τ , мс	Амплитуда, %	Фаза	τ , мс	Амплитуда, %
1-я быстрая	0,01	18	1-я быстрая	0,011	19	1-я быстрая	0,01	18
2-я быстрая	0,031	12,5	2-я быстрая	0,03	11	2-я быстрая	0,049	16
промежуточная	0,49	22	промежуточная	0,94	16	промежуточная	0,84	18
медленная	1,53	46,5	1-я медленная	4,7	35	1-я медленная	5,9	11
			2-я медленная	18,9	19	2-я медленная	21,9	39

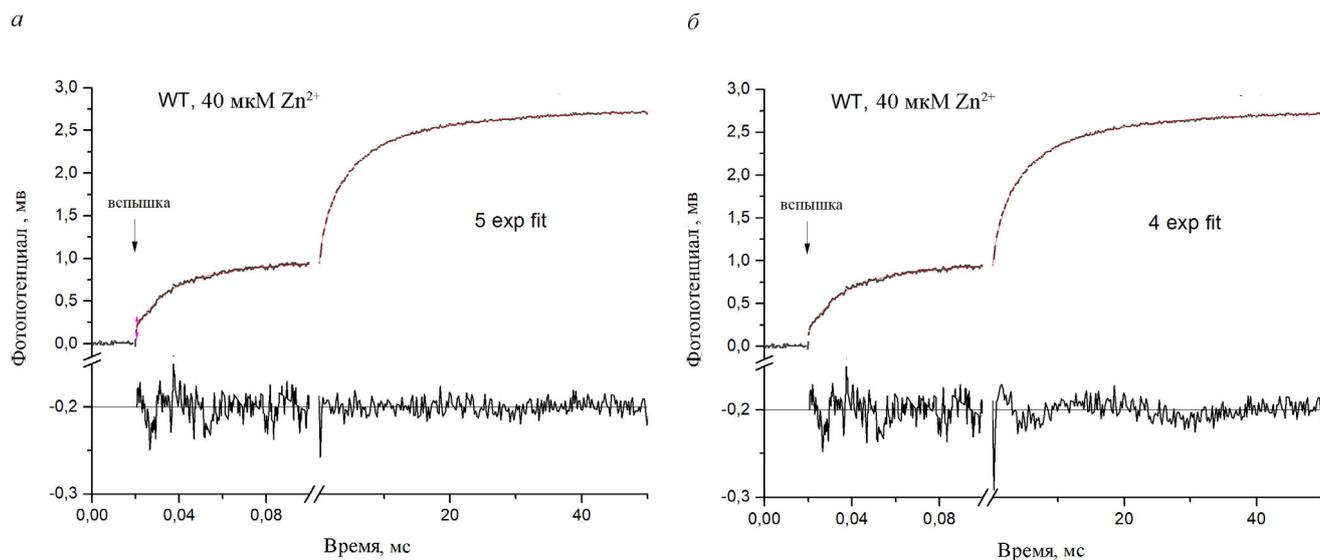


Рис. 2. Кинетика образования мембранного потенциала при переходе F→O COX из *R. sphaeroides* COX в присутствии Zn^{2+} . *a* – Полученные данные были проанализированы с помощью 5-экспоненциальной аппроксимации. *б* – Данные были проанализированы с использованием 4-экспоненциальной аппроксимации. Графики остаточных значений свидетельствуют, что в присутствии Zn^{2+} «медленная» миллисекундная фаза кинетики подразделяется на две фазы (подробности см. в тексте статьи и табл. 1). Условия показаны на рис. 1

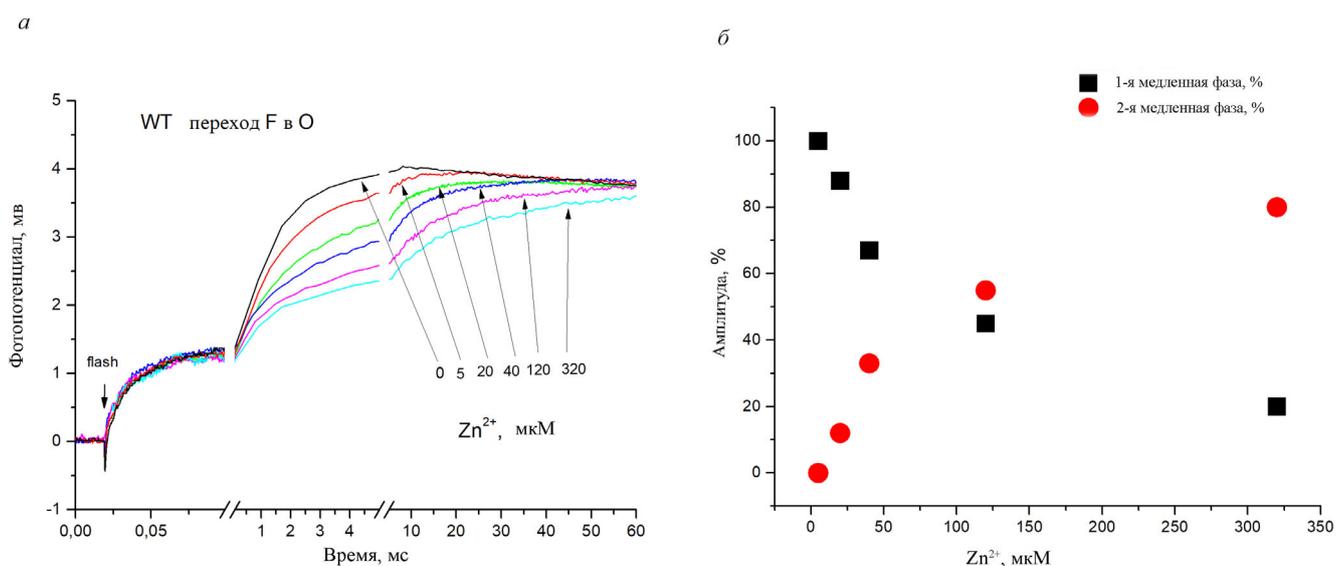


Рис. 3. *a* – Кинетика образования мембранного потенциала во время перехода COX из *R. sphaeroides* из состояния F в состояние O при различных концентрациях Zn^{2+} , добавленного к протеолипосомам. *б* – Зависимость величины 1-й и 2-й медленных протонных фаз от концентрации Zn^{2+} . Условия приведены на рис. 1

Сумма величин двух медленных составляющих, наблюдаемая в присутствии Zn^{2+} (табл. 1), соответствует величине медленного компонента, наблюдаемого в отсутствие Zn^{2+} . Постоянные времени 1-й и 2-й медленных фаз значительно длиннее, чем у медленной фазы, наблюдаемой при отсутствии Zn^{2+} . Следует отметить, что повышение концентрации Zn^{2+} с 40 до 320 мкМ не

изменяет константы времени для 1-й и 2-й медленных фаз, но изменяет их амплитуды (обсуждается в следующем разделе). Изменение константы времени наиболее медленного компонента, наблюдаемого в присутствии и при отсутствии Zn^{2+} , согласуется со снижением стационарного количества оборотов, которое было отмечено при добавлении Zn^{2+} [23–24].

Таблица 2. Зарегистрированная спектроскопически кинетика реокисления гема *a* в СОХ дикого типа (WT) из *R. sphaeroides* СОХ в присутствии или при отсутствии 120 мкМ Zn²⁺

WT			WT + 120 мкМ Zn ²⁺	
Фаза	τ, мс	Величина, %	τ, мс	Величина, %
1	0,4	33	0,61	42
2	1,6	55	6,2	48
3	9	12	30,9	10

Концентрационная зависимость влияния Zn²⁺ на кинетику образования мембранного потенциала. На рис. 3, *a* показаны фотоэлектрические ответы СОХ в присутствии различных концентраций Zn²⁺ (вплоть до 320 мкМ). Кривые были нормализованы с использованием амплитуды микросекундной части (1-я быстрая + 2-я быстрая фазы) кинетических кривых, которая не изменяется при добавлении Zn²⁺. Мультиэкспоненциальный анализ (рис. 2) показывает, что повышение концентрации Zn²⁺ от 40 до 320 мкМ изменяет амплитуду 1-й и 2-й медленных фаз без заметного изменения временных констант (табл. 1). На рис. 3, *б* представлена зависимость амплитуд 1-й и 2-й медленных фаз от концентрации Zn²⁺. Очевидно, что по мере повышения концентрации Zn²⁺ амплитуда 1-й медленной фазы уменьшается, в то время как амплитуда 2-й медленной фазы становится доминирующей.

Влияние Zn²⁺ на кинетику перехода F→O, регистрируемую на основе изменений оптического поглощения гема. Кинетика событий, происходящих после индуцированного светом ввода электрона от Rubru в СОХ, предварительно переведенную в F-состояние, также регистрировалась по изменениям величины оптического поглощения гемовых центров. Увеличение значения поглощения при 444 нм (не разрешенный по времени скачок вверх на кривых, рис. 4, *a*) вызвано восстановлением гема *a* в результате

переноса электрона от Cu_A. Последующее снижение величины поглощения при 444 нм связано с переносом электрона от гема *a* в гем-медный биядерный центр, приводящее к восстановлению оксиферрильной формы гема *a*₃ (Fe⁴⁺=O²⁻) с образованием окисленного состояния гема *a*₃ (состояние O).

В кинетике реокисления гема *a* в отсутствие Zn²⁺ (рис. 4, *a*, «контроль») разрешены две фазы с τ ~0,4 и 1,6 мс (см. табл. 2), совпадающие по времени с промежуточной и медленной электрогенными протонными фазами. Небольшая третья фаза (~5–15%) от общей величины) с τ ~10 мс (см. табл. 2) ассоциирована с реокислением гема *a* в небольшой популяции молекул фермента, которые не способны осуществлять ферментативную реакцию [11]. В присутствии 120 мкМ Zn²⁺ реокисление гема *a* существенно замедляется (рис. 4, *a*) и хорошо описывается двумя экспоненциальными фазами с τ ~0,6 и ~6,2 мс (табл. 2), которые соответствуют промежуточной фазе и медленной фазе 1, наблюдаемым в электрометрических измерениях. Также обнаруживается третья минорная фаза (~10% от общей величины) с τ ~30 мс, ассоциированная с небольшой популяцией молекул фермента, которые не способны осуществлять ферментативную реакцию. Наиболее заметным является отсутствие компонента оптических данных, который соответствует медленной фазе 2 в присутствии Zn²⁺ (рис. 4, *б*). Медленная электрогенная фаза 2 является оптически «молчащей».

Влияние ионов Zn²⁺ на Р-стороне мембраны на кинетику образования мембранного потенциала в мутантных формах СОХ (N139D и D132N) на входе протон-проводящего D-канала. Аминокислотная замена N139D в СОХ из *R. sphaeroides*, локализованная немного выше входа в протон-проводящий D-канал, устраняет перекачивание протонов через мембрану, но не влияет на способность СОХ восстанавливать кислород [9]. Как ранее было показано, электрометрические измерения перехода F→O мутантной формы СОХ N139D свидетельствуют об отсутствии ки-

Таблица 3. Кинетические фазы, наблюдаемые при использовании электрометрических методов после фотоинъекции электрона, приводящего к переходу F→O в реконструированной в протеолипосомах мутантной форме N139D СОХ из *R. sphaeroides* в отсутствие Zn²⁺ и в присутствии 100 мкМ Zn²⁺

N139D			N139D + 100 мкМ Zn ²⁺				
Фаза	τ, мс	Величина, %	Фаза	τ, мс	Величина, %		
1	1-я быстрая	0,0094	35	1	1-я быстрая	0,014	32
2	2-я быстрая	0,058	30	2	2-я быстрая	0,071	29
3	медленная	0,85	35	3	медленная	0,62	39

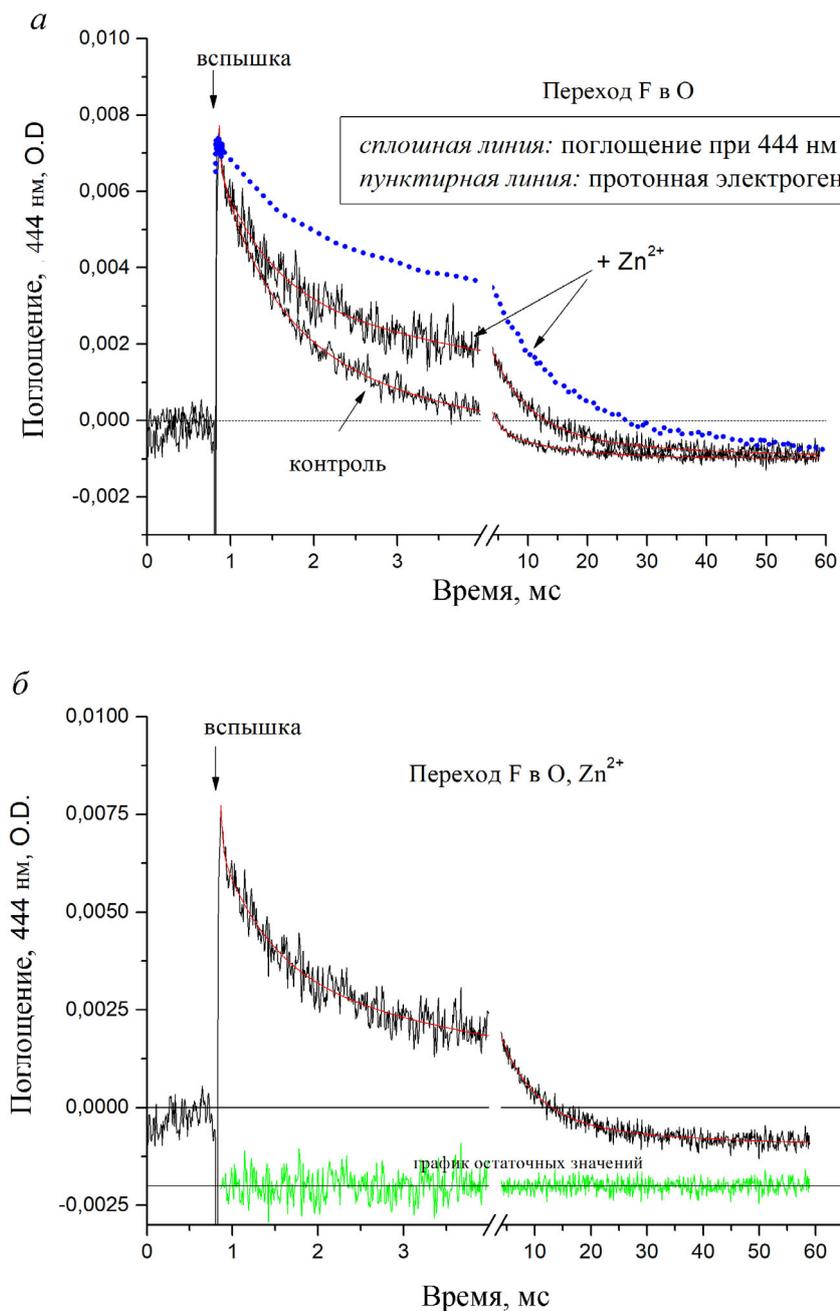


Рис. 4. Влияние Zn^{2+} на кинетику изменений оптического поглощения гемов *R. sphaeroides* COX во время перехода F→O после введения электрона в фермент в состоянии F. *а* – Кинетика изменения значений поглощения при 444 нм в отсутствии Zn^{2+} и после добавления Zn^{2+} (черные сплошные линии – это измеренные кривые, красные сплошные линии – обработанные данные). Также показана (синяя пунктирная линия) кинетика такого же перехода F→O, зарегистрированная с помощью электрометрии на основе измерения скорости образования мембранного потенциала. *б* – Обработка экспериментальных данных с помощью двухэкспоненциальной модели кинетики перехода F→O, регистрируемой по изменению величины оптического поглощения при 444 нм в присутствии Zn^{2+} , также внизу показан график остаточных значений. Условия: конечный образец содержал COX (~20 мкМ) в 5 мМ Tris-ацетатном буфере и 0,05–0,1% додецилмальтозида, 40 мкМ Rubru, 10 мМ анилина и 2 мМ H_2O_2 . Две кривые оптического поглощения на панели (а) показаны после их нормализации относительно величины фотовосстановления гема *а*

нетической фазы, соответствующей переносу протонов из водной фазы с N-стороны в сайт загрузки протонов (PLS), но при этом сохраняются как быстрые фазы (1-я и 2-я), так и фа-

за ($\tau \sim 0,6$ мс), соответствующая переносу протонов из водной фазы с N-стороны мембраны в BNC (рис. 5). Электрогенная фаза, соответствующая переносу протонов из водной фазы

с N-стороны в PLS, отсутствует в случае этого не перекачивающего мутанта. Добавление Zn^{2+} не оказывало заметного влияния на электрогенную фазу, наблюдаемую в отсутствии Zn^{2+} (рис. 5, табл. 3). На вставке в рис. 5 показано, что нет эффектов на пассивную разрядку мембранного потенциала в присутствии Zn^{2+} в течение секунд.

Аминокислотная замена D132N во входном участке D-канала, в отличие от замены N139D, вызывает значительное подавление способности фермента восстанавливать кислород, также как и способности перекачивать протоны. На рис. 6 представлена кинетика образования мембранного потенциала мутантной формой D132N в отсутствии Zn^{2+} и в присутствии Zn^{2+} как после 5, так и после 10 мин инкубации перед проведением измерений. На рис. 6, а показаны экспериментальные кривые, нормализованные по максимальной амплитуде, в то время как на рис. 6, б кривые были нормализованы с использованием амплитуд быстрых фаз. Быст-

рый микросекундный электрогенный ответ мутантной формы D132N сходен с ответом фермента WT (табл. 4). Наиболее заметный эффект аминокислотной замены D132N заключается в низкой величине амплитуд протонных фаз (~0,73 и ~3,7 мс) (табл. 4) [8]. Поскольку замена D132N эффективно блокирует вход в канал, это замедление протонных миллисекундных фаз должно быть связано с движением внутренних протонов внутри D-канала. Снижение со временем величины микросекундной части кинетики (рис. 6, а), вероятно, является следствием увеличения степени восстановления гема а перед вспышкой из-за сниженной стационарной активности мутантной формы D132N, которая еще более снижается в присутствии Zn^{2+} .

Основной эффект добавления Zn^{2+} на P-сторону мутанта D132N проявляется в появлении очень медленной фазы (147 мс, табл. 4). Для стационарной активности мутантной формы

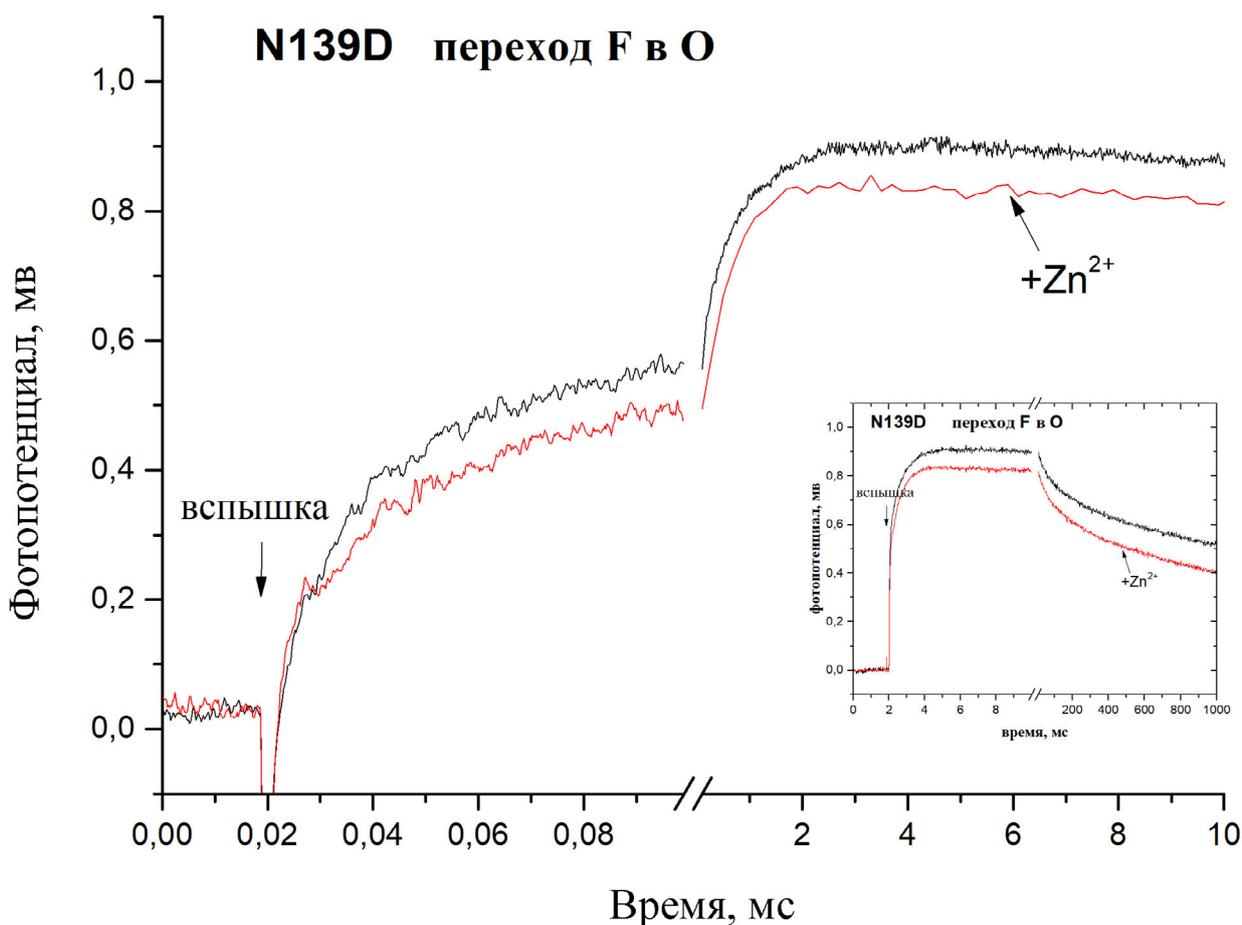


Рис. 5. Влияние Zn^{2+} , добавленного к P-стороне мутантной формы N139D COX из *R. sphaeroides*, на кинетику образования мембранного потенциала во время перехода F→O. Во вставке показаны те же данные, отложенные против более крупной временной шкалы. Условия описаны на рис. 1

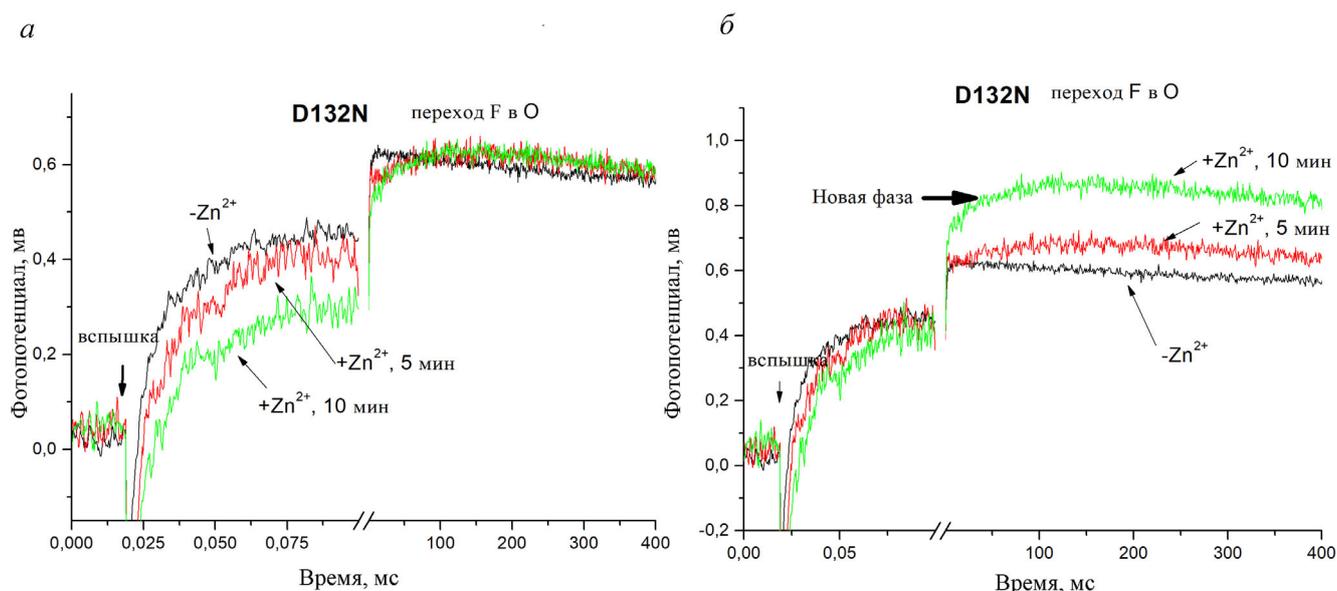


Рис. 6. Влияние Zn^{2+} на кинетику образования мембранного потенциала мутантной формой D132N. *а* – Кривые были нормализованы с использованием общей величины. *б* – Кривые были нормализованы с использованием амплитуды быстрых фаз (в точке $\sim 0,1$ мс). Условия описаны на рис. 1. Показано время инкубации

D132N характерен «обратный» дыхательный контроль, что указывает на то, что значительная часть протонов, поступивших в BNC, приходят с P-стороны, а не с N-стороны, как в случае COX WT. Однако в одноэлектронных измерениях в режиме одного оборота фермента не наблюдается отрицательный электрометрический эффект. Его отсутствие возможно по двум причинам. 1) В отсутствие Zn^{2+} протон в мутантной форме D132N переносится в BNC как с P-стороны через PLS в части фермента, так и из внутреннего источника внутри D-канала, но в немного большей части фермента. Это согласуется с низкой электрометрической амплитудой миллисекундной фазы, а также с положительным знаком, указывающим на суммарный положительный заряд, движущийся изнутри наружу. Это не могло бы происходить постоянно в слу-

чае множественных оборотов фермента, которые основываются на потоке протонов с P-стороны мембраны, так как вход в D-канал на N-стороне в результате аминокислотной замены D132N блокирован. 2) В качестве альтернативы перенос протона с P-стороны в BNC может быть очень медленным (сотни миллисекунд) и не может быть разрешен из-за слияния с пассивной разрядкой мембраны ($\tau \sim 0,5$ с).

Если связывание Zn^{2+} вызывает блокировку доступа с P-стороны в биядерный центр, для протонов единственным путем достижения BNC является путь с N-стороны мембраны через D-канал. Однако в связи с заменой D132N доставка протонов через D-канал с N-стороны сильно заингибирована, что приводит к заметной, но очень медленной электрогенной фазе, наблюдаемой в присутствии Zn^{2+} .

Таблица 4. Кинетические фазы, наблюдаемые с помощью электрометрических методов, после фотоинъекции одного электрона для инициации перехода F→O в мутантной форме D132N COX из *R. sphaeroides* в отсутствии Zn^{2+} и в присутствии 100 мкМ Zn^{2+}

D132N				D132N + 100 мкМ Zn^{2+} , 5 минут инкубации			
Фаза	τ , мс	Амплитуда, %		Фаза	τ , мс	Амплитуда, %	
1	1-я быстрая	0,01	58	1	1-я быстрая	0,011	26
2	2-я быстрая	0,035	18	2	2-я быстрая	0,030	19
3	промежуточная	0,734	17	3	промежуточная	0,53	16
4	медленная	3,7	7	4	медленная	147	39

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, представленные в настоящей работе, подтверждают, что Zn^{2+} связывается с Р-стороной СОХ, и это вызывает ингибирование фермента. Эффекты ингибирования фермента с Р-стороны ионами Zn^{2+} можно резюмировать в следующем виде.

1. Основное воздействие на фермент дикого типа заключается в разделении медленной электрогенной фазы на два компонента: 1-ю и 2-ю медленные фазы. Обе фазы замедлены по сравнению с медленной фазой в отсутствие Zn^{2+} . Повышение концентрации Zn^{2+} от 20 до 320 мкМ не вызывает изменений констант времени 1-й и 2-й медленных фаз. Сумма величин 1-й и 2-й медленных фаз остается постоянной, поскольку при повышении концентрации Zn^{2+} происходит увеличение амплитуды 2-й медленной фазы, и в то же время величина 1-й медленной фазы уменьшается. Вторая медленная фаза не связана с переносом электронов от гема *a* на ВНС, в то время как промежуточная и 1-я медленная фаза сопровождаются окислением гема *a*.

2. Zn^{2+} не оказывает влияния на электрогенные фазы, наблюдаемые в несопряженной мутантной форме N139D.

3. Связывание Zn^{2+} с Р-стороной мутантной формы D132N приводит к появлению очень медленной фазы.

Электрогенные эффекты в ферменте WT. Чтобы обсудить влияние Zn^{2+} , сначала необходимо обсудить кинетику перехода $F \rightarrow O$ в отсутствие Zn^{2+} . Подробности в табл. 5 и на рис. 7.

После лазерной вспышки Cu_A восстанавливается под действием Rubp в течение 1 мкс. Микросекундная нечувствительная к действию KCN электрогенная часть кинетики перехода $F \rightarrow O$ в СОХ из *R. sphaeroides* состоит из двух компонентов [11]. Первая быстрая фаза (стадия 1 на рис. 7) относится к переносу электрона от Cu_A на гем *a*. Происхождение второй быстрой фазы неизвестно. Среди её возможных источников [11]: а) перенос протона от E286 на PLS, обозначенный как стадия 2 на рис. 7; б) перемещение протона внутри каналов D или K; в) высвобождение протона из кластера $[-OH-Mg^{2+}-(E254)-H_3O^+]$ в объемную водную фазу на Р-стороне, запускаемое переносом электрона от Cu_A на гем *a*. Вариант (в) может быть исключен отсутствием влияния Zn^{2+} на 2-ю быструю фазу. Мы предполагаем, что 2-я быстрая фаза соответствует переносу протона от E286 на PLS (стадия 2 на рис. 7).

За быстрыми фазами следуют две KCN-чувствительные электрогенные компоненты (0,5 и 1,5 мс), которые связаны с этапами переноса электрона от гема *a* на ВНС. «Промежуточная» электрогенная фаза (стадия 3 на рис. 7) связана с переносом протона из N-фазы для репротонирования E286. Медленная фаза (стадия 4 на рис. 7) соответствует выбросу перекачиваемого протона из PLS и сопряженному электрогенному поглощению из N-фазы химического протона в ВНС.

Влияние Zn^{2+} можно объяснить с помощью модели, в которой эффект связывания Zn^{2+} с Р-стороной СОХ обусловлен ингибированием скорости выхода протонов из PLS в объемную

Таблица 5. Электрогенные фазы, наблюдаемые во время перехода $F \rightarrow O$ СОХ дикого типа из *R. sphaeroides*

Фаза	τ	Амплитуда *	Заряды поперек мембраны**	Основные перемещения зарядов
1 1-я быстрая	10 мкс	18%	0,33	перенос электрона: $Cu_A \rightarrow$ гем <i>a</i>
2 2-я быстрая	31 мкс	12,5%	0,23	неотнесенный перенос H^+
3 промежуточная	0,49 мс	37%	0,68	1. поглощение перекачиваемого протона в PLS; 2. перенос электрона: гем <i>a</i> \rightarrow гем a_3 (30–35%).
4 медленная	1,53 мс	32,5%	0,6	1. поглощение химического протона в ВНС; 2. высвобождение перекачиваемого протона из PLS на Р сторону; 3. перенос электрона: гем <i>a</i> \rightarrow гем a_3 (55–60%).
			$\Sigma = 1,84$	

* Вклад промежуточной и медленной протонной фаз рассчитан на основе значений из табл. 1, предполагая последовательную модель двух протонных фаз [51].

** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя.

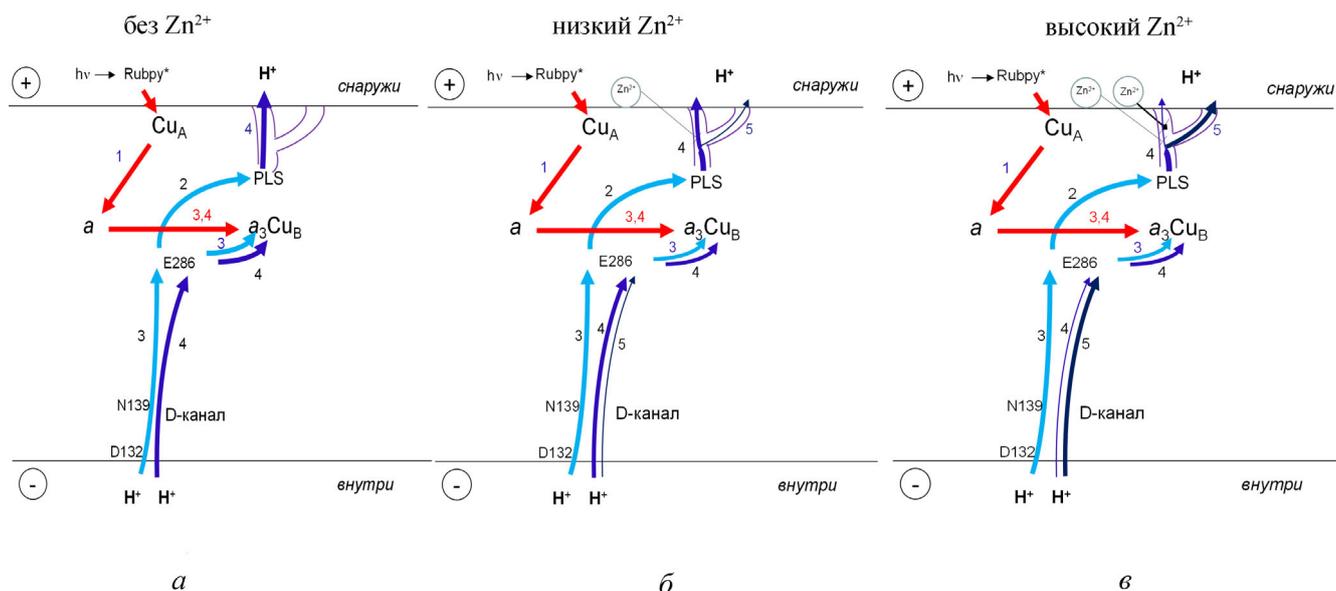


Рис. 7. Электрогенные стадии, сопряженные с переходом F→O в результате переноса одного электрона, инициированного светом, в СОХ из *R. sphaeroides* в отсутствии или в присутствии Zn^{2+} . Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электронов; синие стрелки – транслокация протонов. Показан разветвленный канал выхода протонов. Диаграммы, расположенные слева, в центре и справа, показывают 3 состояния фермента: без Zn^{2+} (а), в присутствии низких (б) или высоких (в) концентраций Zn^{2+} соответственно. На рис. 7, б и в показана не специфическая локализация Zn^{2+} -связывающих сайтов, а электрогенные стадии, на которые влияет Zn^{2+} . Ионы цинка в низкой концентрации замедляют транспорт протонов по основному протон-высвобождающему пути (4). В результате действия высокой концентрации Zn^{2+} медленный протон-высвобождающий путь (5) преобладает над основным. См. подробности в тексте

водную фазу на Р-стороне. Ингибирующее действие Zn^{2+} в отношении фермента WT явно указывает на то, что должно быть два различных сайта связывания, приводящих к ингибированию. Этот вывод основан на влиянии изменения концентрации Zn^{2+} . При низких концентрациях Zn^{2+} (например, <20 мкМ) медленная фаза разбивается на 1-ю и 2-ю медленные фазы. Константы времени для промежуточной и 1-й и 2-й медленных фаз остаются неизменными при возрастании концентрации Zn^{2+} . Однако повышение концентрации Zn^{2+} вызывает изменение амплитуды 1-й и 2-й медленных фаз, и при этом сумма амплитуд этих двух фаз поддерживается на одном уровне. Поэтому мы предположили присутствие высокоаффинного сайта ($K_d < 20$ мкМ) и низкоаффинного сайта ($K_d \sim 100$ мкМ) для ионов Zn^{2+} , которым характерны различные ингибиторные эффекты в отношении фермента. Сайт с высокой аффинностью, наиболее вероятно, похож на сайт, наблюдаемый при стационарных измерениях тока электронов в фермент, индуцированный слабыми восстановителями [30].

Чтобы объяснить влияние Zn^{2+} , мы высказали предположение о том, что есть два пути выхода протонов, высвобождающихся из PLS, с помощью которых они могут достигнуть объем-

ной водной фазы на Р-стороне мембраны. Это согласуется с результатами ранее опубликованной работы по молекулярному моделированию путей переноса молекул воды в объемную водную фазу на Р-стороне, которые, в принципе, могут также служить для переноса протонов [53]. В отличие от входных протон-проводящих каналов (каналы D и K) с четко определенной локализацией пути, каналы выхода протона не имеют четкой локализации. Это сеть водородных связей. Она соединяет различными путями пропионатные группы гемов *a* и *a*₃ с внешней стороной молекулы фермента [7]. Есть достаточные основания предположить, что может быть более одного пути выхода протона с различными внутренними скоростями прохода протона и с участием различных аминокислотных остатков. Использование параллельных путей движения протонов с различными внутренними скоростями не редкость для регуляции протон-проводящих путей в белках. Например, протеородопсин из *Exiguobacterium sibiricum*, у которого есть два пути переноса протонов на шиффово основание с различными внутренними скоростями, равными примерно 0,6 и 4 мс [47–48].

Полученные данные согласуются с двумя каналами выхода протонов в СОХ из *R. sphaeroides*,

которые имеют внутренние константы времени, ассоциированные с высвобождением протонов, равные 1,5 и 18,9 мс. Они показаны на рис. 7, б и в. В отсутствие Zn^{2+} используется только один путь, для которого характерна быстрая кинетика ($\tau = 1,5$ мс). Высвобождение протона из PLS сопряжено с доставкой другого (химического) протона в BNC, и это соответствует медленной фазе в отсутствие Zn^{2+} (стадия 4, рис. 7, а). Связывание Zn^{2+} с высокоаффинным сайтом замедляет перенос протона из быстрого пути до 4,7 мс, и протоны, использующие этот путь при низких концентрациях Zn^{2+} , ответственны за 1-ю медленную фазу (стадия 4, рис. 7, б).

При повышении концентрации Zn^{2+} загруженность низкоаффинного сайта связывания ($K_d \sim 100$ мкМ) возрастает, и мы предполагаем, что связывание Zn^{2+} с этим сайтом полностью блокирует вклад 4,7 миллисекундного пути, делая скорость переноса протона через этот путь более медленной, чем через медленный протон-проводящий путь. Вследствие этого высвобождение протона может протекать только через 18,9 миллисекундный путь, соответствующий 2-й медленной фазе (стадия 5, рис. 7, в). При 40 мкМ Zn^{2+} преобладает выход протона через 4,7 миллисекундный путь (рис. 3, б), но по мере увеличения концентрации Zn^{2+} повышенная загруженность низкоаффинного сайта увеличивается и, следовательно, для высвобождения протона из PLS должен использоваться 18,9 миллисекундный путь. В этом случае преобладает 2-я медленная фаза (рис. 7, в). Поскольку передвижения заряда, ассоциированные с 1-й и 2-й медленными фазами, по существу, одинаково-

вы, сумма их амплитуд остается постоянной при различных концентрациях Zn^{2+} .

Перенос электрона от гема *a* в BNC может происходить до доставки протона от E286 до BNC за счет использования локально доступного протона. При отсутствии Zn^{2+} процесс переноса электрона в BNC является двухфазным, и он наблюдается во время промежуточной и медленной фаз. Доставка протона от E286 в BNC, однако, откладывается до депротонирования PLS. В присутствии Zn^{2+} процесс переноса электрона в BNC также является двухфазным и наблюдается во время промежуточной и 1-й медленной фазы. Однако доставка протона от E286 в BNC происходит и в 1-й, и во 2-й медленных фазах, совпадая со скоростью высвобождения протона из PLS через два пути. Перенос электрона в BNC завершается до 2-й медленной фазы, которая, следовательно, оптически «бесшумна». В табл. 6 представлены части 1-й и 2-й медленных фаз в виде функции от концентрации Zn^{2+} , а также оценки количества перенесенного заряда относительно доли мембранного диэлектрика. Для подсчета перенесенного заряда были использованы две различные модели. При этом предполагалось, что промежуточная и медленные (1-я и 2-я) фазы протекают либо параллельно, либо последовательно друг за другом. При высоких концентрациях Zn^{2+} доля 1-й медленной фазы не стремится к нулю, но остается равной ~20%. Это соответствует электрогенному переносу заряда на расстояние примерно 0,19 и 0,16 мембранного диэлектрика в параллельной и последовательной моделях соответственно (табл. 6). По всей видимости, амплитуда 1-й медленной фазы при высокой концент-

Таблица 6. Зависимость 1-й и 2-й медленных фаз транслокации зарядов, сопряженных с переходом из состояния F в состояние O COX дикого типа из *R. sphaeroides*, от концентрации Zn^{2+}

[Zn^{2+}] мкМ	F1, 1-я медленная фаза*	F1, заряды через мембрану**	F1, заряды через мембрану***	F2, 2-я медленная фаза*	F2, заряды через мембрану**	F2, заряды через мембрану***
5	100%	0,94	0,75	0%	0	0
20	88%	0,83	0,66	12%	0,11	0,11
40	65%	0,61	0,49	35%	0,33	0,31
120	45%	0,42	0,34	55%	0,52	0,49
320	20%	0,19	0,16	80%	0,75	0,71

* $F1 = 100\% \times \text{ампл. (1-я медленная)} / (\text{ампл. (1-я медленная)} + \text{ампл. (2-я медленная)})$.

* $F2 = 100\% \times \text{ампл. (1-я медленная)} / (\text{ампл. (1-я медленная)} + \text{ампл. (2-я медленная)})$.

** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя. Вклад 2-й медленной протонной фазы был рассчитан на основе кажущихся значений с учетом параллельных процессов, протекающих в промежуточной, 1-й и 2-й медленных фазах.

*** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя. Вклад протонных фаз был рассчитан на основе кажущихся значений с учетом проходящих последовательно друг за другом промежуточной и 1-й медленной фаз, а также промежуточной и 2-й медленной протонных фаз, как было описано ранее [51].

рации Zn^{2+} ($\sim 0,19$ или $\sim 0,16$ от мембранного диэлектрика) включает электрогенный перенос протона от E286 в BNC ($\sim 0,06$, принимая во внимание электрогенную дистанцию $\sim 0,12$ от мембранного диэлектрика [11] и вклад кинетики реокисления гема *a* в 1-й медленной фазе, равный $\sim 0,48$ (табл. 2)) и какой-то дополнительный электрогенный процесс. Мы связываем этот дополнительный электрогенный процесс с переносом протона от PLS к развилке двух путей выхода протонов, что определяет скорость 1-й медленной фазы. Этот процесс происходит в обеих популяциях фермента и непосредственно связан с переносом электронов в BNC. На этой точке разделения (развилке) могут находиться несколько возможных аминокислотных остатков. Например, возможно, это могут быть H411, D407 и D412, как показано на рис. 1 в статье Mills et al. [23]. Еще предстоит выяснить, как эти два пути выхода протона могут быть связаны с каналами R и T выхода воды, предсказанными с помощью метода молекулярного моделирова-

ния [53]. Чтобы выйти за рамки предположений, необходимы дальнейшие исследования с привлечением методов биоинформатики и мутагенеза.

Электрогенные эффекты в отношении мутантных форм N139D и D132N. Высвобождение протона из PLS в водную фазу с P-стороны не наблюдается в несопряженной мутантной форме COX N139D. Следовательно, связывание Zn^{2+} с P-стороной не оказывает влияния на протекание электрогенных фаз, наблюдаемых в случае этой мутантной формы. Это подтверждает вывод о том, что все эффекты Zn^{2+} могут быть отнесены к его влиянию на скорость выхода протона из PLS (рис. 8).

Блокировка D-канала в результате замены D132N достаточно сильна, чтобы при стационарном обороте протоны достигали BNC, используя в обратном направлении путь между объемной водной фазой с P-стороны и PLS. Однако в настоящей работе, в которой использовался метод фотоиницированной «инъекции» электрона в

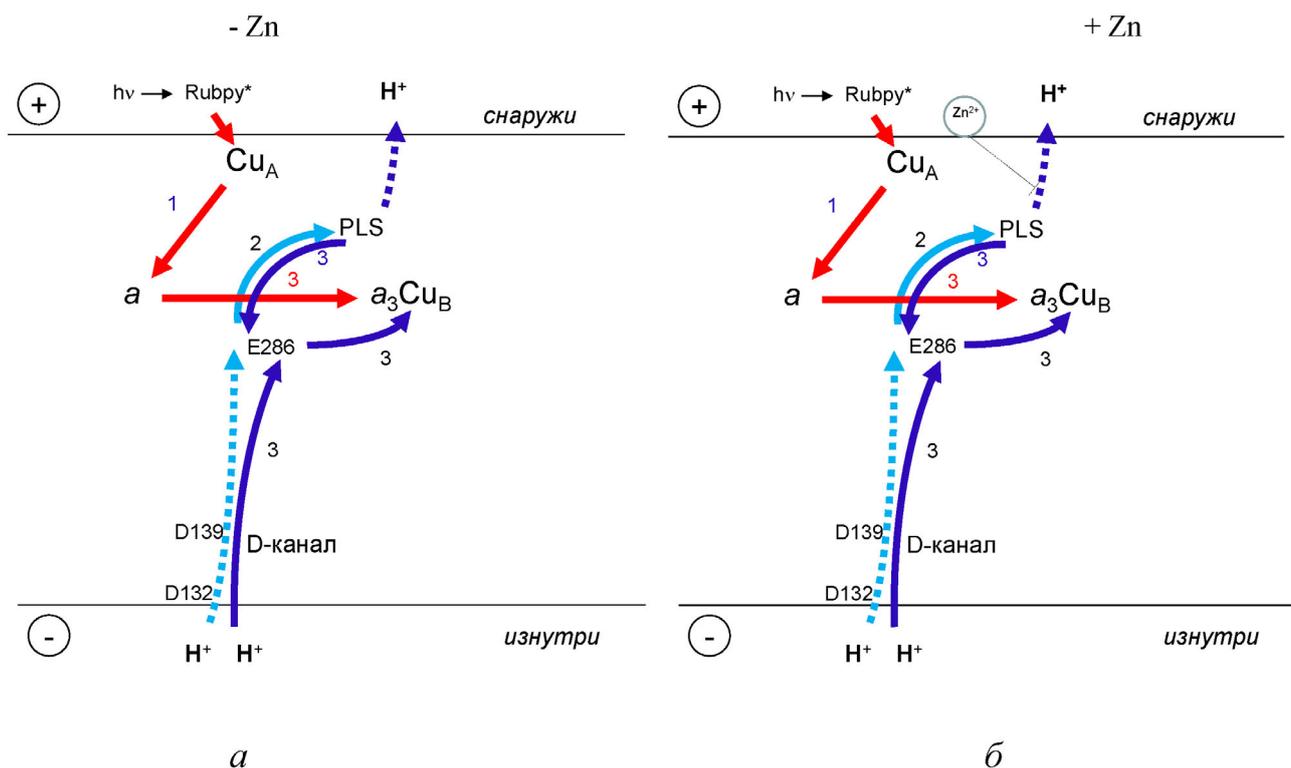


Рис. 8. Электрогенные стадии, сопряженные с фотоиницированным переносом одного электрона и переходом F→O мутантной формы N139D COX из *R. sphaeroides* при отсутствии (а) и в присутствии (б) ионов Zn^{2+} . Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электрона; голубые и синие стрелки – транслокация протона. Стадия переноса перекачиваемого протона, связанная с «промежуточной» протонной электрогенной фазой в ферменте WT, отсутствует в случае несопряженной мутантной формы N139D [9]. Эта стадия показана пунктирной линией. Также предполагается перенос протона от E286 на PLS, но он происходит одновременно с переносом протона в обратном направлении (сплошные линии, стадия 3). Высвобождение протона из PLS в P-фазу показано в виде пунктирной линии. Отсутствие значительного эффекта ионов Zn^{2+} на медленную фазу мутантной формы N139D указывает на то, что именно перенос протонов из PLS в P-фазу ингибируется Zn^{2+} в COX дикого типа

D132N

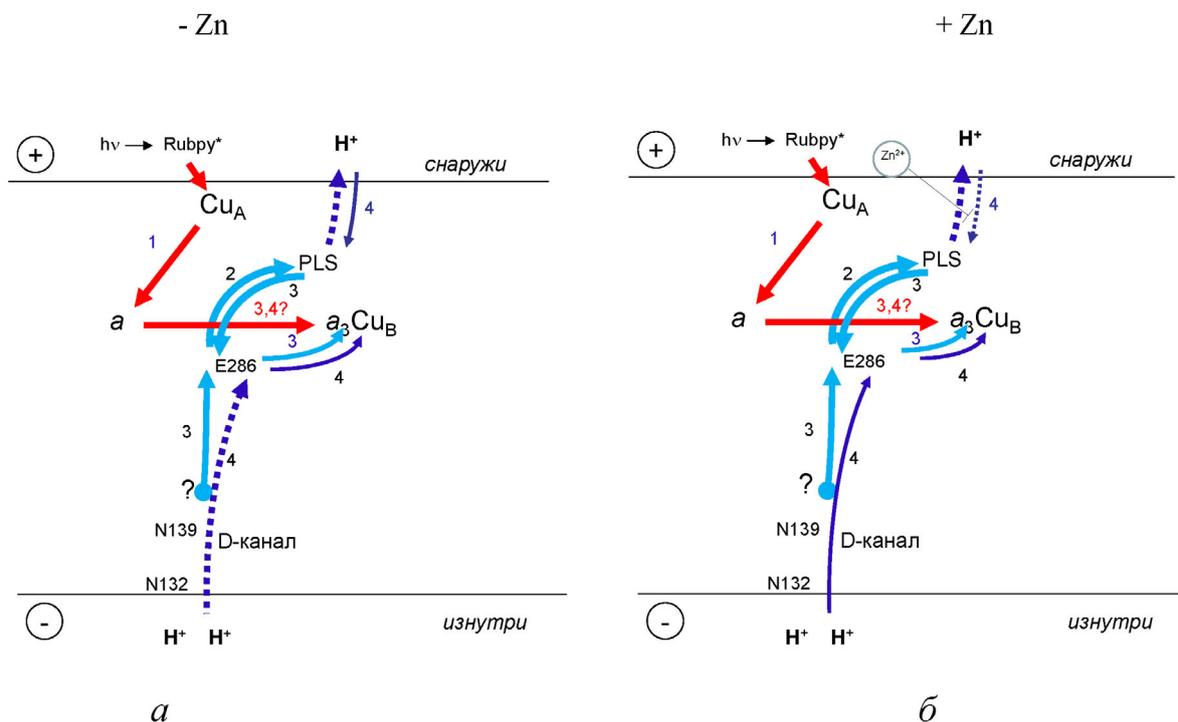


Рис. 9. Электрогенные стадии, сопряженный с фотоиницированным переносом одного электрона при переходе F→O мутантного D132N белка COX из *R. sphaeroides* в отсутствии (а) и в присутствии (б) Zn^{2+} . Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электронов; голубые и синие стрелки – транслокация протонов. Внутренний донор протонов в D-канале точно не известен, и он выделен кругом

режиме одного оборота фермента, обратный электрогенный ответ, который можно было ожидать, основываясь на измерениях в стационарных условиях [23], прямо не наблюдается (рис. 9).

Одним возможным объяснением для наблюдаемых электрогенных фаз является то, что в мутантной форме D132N COX перенос электрона от гема *a* в BNC индуцирует перенос протона с Р-стороны в BNC у части популяции фермента (тонкая сплошная линия в фазе 4 на рис. 9, а). Однако в другой части фермента протон доставляется из внутреннего источника внутри D-канала с такой же скоростью, но с противоположным знаком, поскольку протоны перемещаются в противоположных направлениях (фаза 3 на рис. 9, а). Так как эти два процесса протекают одновременно, но с противоположными электрогенными эффектами, итоговая амплитуда очень мала.

Другим объяснением является то, что электрогенная фаза 3 (рис. 9) отражает быструю доставку протона в BNC от внутреннего донора внутри D-канала, однако этот процесс переноса протона является неполным, так как pK_a внутреннего донора либо очень высока (нет полного

депротонирования) или очень низка (исходно протонирован не полностью). Этот эффект (не очень подходящее значение pK_a , частичный перенос протонов в BNC) будет незаметен, если произойдет быстрое репротонирование этого донора из D-канала. Однако быстрый перенос протона из N-фазы запрещен мутацией (пунктирная линия фазы 4 на рис. 9, а). Популяция молекул фермента, для которых протон не был доставлен в BNC от внутреннего донора внутри D-канала, могут получить протон с Р-стороны. Однако, если перенос протона с Р-стороны происходит очень медленно (сотни миллисекунд), то это не должно обнаруживаться на фоне пассивной разрядки мембраны. В обоих случаях в присутствии Zn^{2+} транспорт протона с Р-стороны заблокирован, и наблюдается очень медленный перенос протона через D-канал (тонкая сплошная линия в фазе 4 на рис. 9, б).

Связь с предыдущими наблюдениями о влиянии Zn^{2+} на транслокацию протонов в цитохром-оксидазе. Физический механизм и вероятные сайты высвобождения протонов, ингибируемые ионами Zn^{2+} . В отличие от результатов исследований с использованием метода флуо-флэш [31], полу-

ченные нами результаты свидетельствуют о том, что связывание Zn^{2+} с СОХ на её Р-стороне снижает скорость перехода $F \rightarrow O$ и ингибирует высвобождение протонов во время этого перехода. При измерении методом флюу-флэш полностью восстановленный фермент реагирует с молекулярным кислородом в режиме одного оборота. Стап данного метода не предполагает ни наличия мембранного потенциала на липосомах, ни слабого потока электронов через фермент, чье присутствие необходимо для проявления ингибирующего эффекта ионов цинка с Р-стороны мембраны при субмиллимолярных концентрациях.

Эффект замедления перехода $F \rightarrow O$, который был изучен в настоящей работе в слабых восстановительных условиях (Rubpy/анилин [24, 30]), вызван действием Zn^{2+} на наиболее медленную стадию каталитического цикла, каковой является скорость-лимитирующая реакция всего цикла цитохромоксидазы. Степень замедления хорошо коррелирует с ингибированием в этих условиях активности цитохромоксидазы (85–90%) [30]. В слабо восстанавливающих условиях предполагается, что ингибирующий эффект может быть обусловлен избирательным взаимодействием ионов цинка с одним или несколькими частично восстановленными промежуточными состояниями каталитического цикла или промежуточными состояниями СОХ, возникающими в течение короткого периода во время перехода одного относительно стабильного промежуточного состояния в другое [24].

Было также предположено, что так называемый «невидимый» ион меди (Cu_B) в центре связывания кислорода в молекуле СОХ может быть тем компонентом, чье восстановление ответственно за связывание Zn^{2+} на внешней стороне при слабых восстановительных условиях [24, 30]. Восстановление Cu_B связано с значительной перестройкой образованной тремя остатками гистидина координационной сферы этого редокс-центра, что может вызвать структурные изменения в белке, приводящие к увеличению активности связывающей группы по отношению к иону Zn^{2+} [54]. Следует отметить, что аминокислотный остаток E286, основной донор протонов для PLS и BNC в «реакционном боксе» цитохромоксидазы, входит в состав петли со связанными между собой ковалентной связью остатками Y288–H284, которые, в свою очередь, взаимодействуют с гемом a_3/Cu_B (H284 является одним из лигандов Cu_B), и с помощью этого взаимодействия могут отслеживать редокс-изменения в активном центре во время восстановления кислорода [55]. С другой стороны, Zn^{2+} -связывающая группа может быть

функционально связана (и влиять на свойства) с сайтом загрузки протонов PLS, который участвует в высвобождении перекачиваемого протона во внешнюю водную фазу [30].

Нужно отметить, что переход из состояния F в состояние O, который разрешается при изучении с помощью метода флюу-флэш, отличается от экспериментов по инъекции электрона от Rubpy тем, что в состоянии F цитохромоксидаза уже содержит дополнительный электрон, поделенный между входными редокс-центрами (Cu_A и гем *a*). В то же время при проведении экспериментов по инъекции электрона от Rubpy в состояние F происходят полные последовательные окислительно-восстановительные превращения Cu_A и гема *a*. В то же время предполагается, что один из возможных путей высвобождения протона и воды сформирован вблизи Cu_A [55–56], что может указывать на значимость в развитии ингибиторного действия ионов цинка также и редокс-превращений Cu_A .

Специфический механизм наблюдаемого замедления этапов переноса протонов ионами Zn^{2+} может иметь различную физическую природу. Поскольку скорость обмена ионов Zn^{2+} в сайте/-ах их связывания, вероятно, намного выше, чем разрешенные по времени электрогенные фазы, ионы Zn^{2+} вряд ли работают как настоящие блокаторы переноса протонов. Однако связывание ионов Zn^{2+} с аминокислотными остатками H, E или D может оказывать прямое или косвенное воздействие на пути переноса протонов. Это может быть реализовано путем связывания с а.о., которые непосредственно вовлечены в высвобождение протонов, или с остатками, которые могут электростатически увеличивать потенциальную энергию для переноса протонов через путь. Связывание а.о. из различных спиральных структур, в принципе, может препятствовать конформационным изменениям белка, сопряженным с высвобождением протонов. Помимо воздействия электростатических сил на а.о., мы также не исключаем того, что Zn^{2+} может прямо ограничивать водные цепочки, которые формируют путь выхода протонов.

На основании этой работы мы предполагаем существование, по крайней мере, двух функционально различных сайтов связывания ионов Zn^{2+} с Р-стороны мембраны и двух функционально различных путей высвобождения перекачиваемого протона. Влияние низких или высоких концентраций ионов цинка может быть результатом, например: 1) ингибирования конформационных изменений во время перекачивания в связи со связыванием Zn^{2+} с остатками близлежащих спиральных участков; 2) связывания Zn^{2+} вблизи или внутри протон-проводяще-

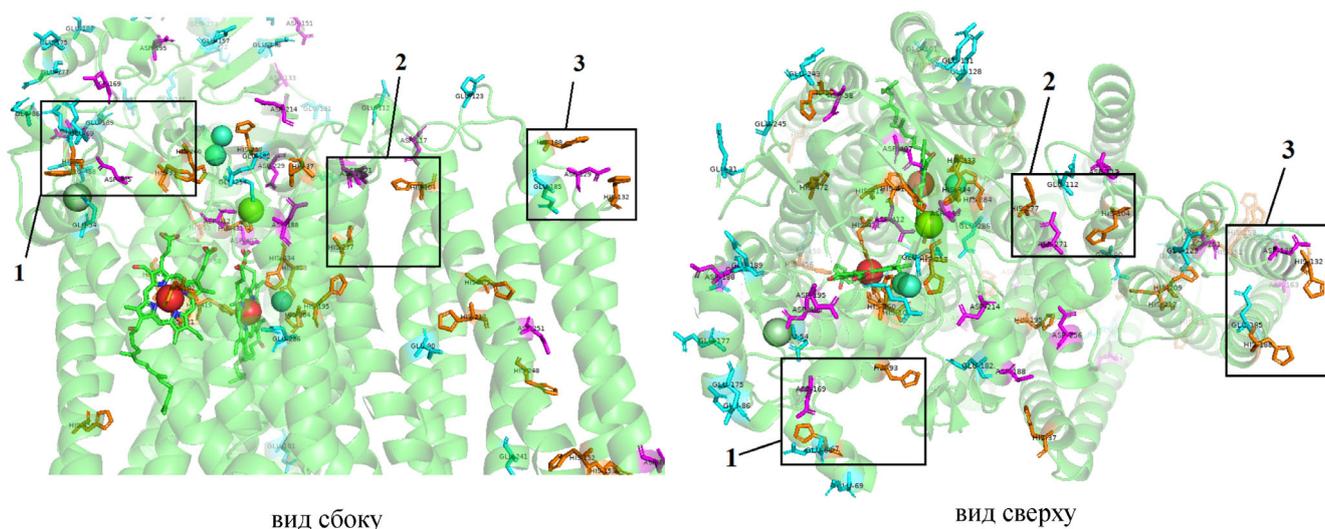


Рис. 10. Вероятные сайты связывания ионов цинка на Р-стороне мембраны в 3D-структуре aa_3 цитохромоксидазы из *R. sphaeroides* (а и б – вид сбоку и сверху соответственно). Показаны боковые цепи и металлосодержащие центры (Cu_A , Cu_B , Mg и геммы). Геммы показаны в виде зеленого проволочного каркаса. Fe, Cu и Mg – круги, раскрашенные в красный, голубой и зеленый цвет соответственно. Остатки Н (His), D (Asp), E (Glu) показаны различным цветом: оливковый, марджента и сине-зеленый соответственно. Три потенциальных сайта связывания ионов Zn^{2+} на Р-стороне мембраны обведены квадратами: 1) His93, His67, Glu66; 2) His104, His277, Asp271; 3) His132, His188, Asp129, Glu185. Обозначения аминокислотных остатков, используемые на рисунке: Н – His; D – Asp; E – Glu. Значения координат цитохром aa_3 -оксидазы из *R. sphaeroides* взяты из архива PDB [7]. Для визуализации использовали программу PyMol

го пути и изменения барьера для переноса протона.

По нашему мнению, одним из наиболее простых и логичных объяснений является предположение, что замедление 1-й медленной фазы по сравнению с медленной фазой фермента дикого типа происходит в результате опосредованного влияния Zn^{2+} (это, возможно, ингибирование изменения конформации белка, если связывание ионов цинка происходит не в непосредственной близости к протон-проводящему пути), в то время как появление 2-й медленной фазы означает более непосредственное ингибирующее действие Zn^{2+} на выход протона через основной (осуществляемый в ферменте WT) путь и, по всей вероятности, является результатом связывания ионов цинка вблизи или внутри протон-проводящего пути. В результате высвобождение протона протекает через более медленный путь. Поскольку 1-я медленная фаза не исчезает полностью даже при высоких концентрациях ионов цинка, это говорит о том, что два режима действия Zn^{2+} не могут протекать параллельно из-за связывания Zn^{2+} в одном и том же сайте.

В качестве предварительных результатов нами были обнаружены три потенциальных сайта связывания ионов цинка на Р-стороне мембраны в 3D-структуре цитохром aa_3 -оксидазы из *R. sphaeroides* (каждый из которых включает по два остатка Н и остатки E/D) (рис. 10). Один из

них находится сильно в стороне (3); один или два других (1 и 2 на рис. 10) расположены недалеко от центров Cu_A и Mg, а также предполагаемых, исходя из молекулярно-динамического исследования митохондриальной цитохромоксидазы [53] R- и T-выводящих воду путей, соединяющих полость иона Mg^{2+} с внешней стороной фермента. Описанные выше участки представляют собой сайты в дополнение к тем остаткам Н и карбоксильным группам, которые являются непосредственно лигандами Cu_A и атома Mg, и вблизи которых может быть организован один из предполагаемых путей выделения протона [55]. Очевидно, что существуют несколько потенциальных сайтов связывания Zn^{2+} , расположенных над биядерным центром и, следовательно, вблизи потенциальных путей высвобождения протонов. Необходимы дальнейшие работы, чтобы найти корреляцию между этими сайтами и двумя Zn^{2+} -связывающими сайтами, обнаруженными в кристаллах митохондриальной цитохромоксидазы, обработанной миллимолярными концентрациями Zn^{2+} [57], с Zn^{2+} -связывающими сайтами на N-стороне COX [58], с Zn^{2+} -связывающими сайтами в комплексе bc_1 [59–60], бактериальных реакционных центрах [61] и др. Биоинформатические и молекулярно-биологические исследования этих эффектов в цитохромоксидазе необходимы и могут быть запланированы в будущем.

ВЫВОДЫ

Ингибирование Zn^{2+} с Р-стороны мембраны было четко продемонстрировано при изучении электрогенных фаз в переходе F→O цитохром-оксидазы с использованием фотоиницируемого введения электрона от Rubru. Полученные результаты показывают, что должно быть два различных сайта связывания Zn^{2+} с различным действием на фермент. Согласно полученным результатам, определено должны быть два пути выхода для протона, высвобождаемого из PLS, чтобы он мог перейти в водную фазу с Р-стороны мембраны, причем каждый путь обладает своей внутренней скоростью высвобождения протона. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами молекулярного моделирования и обеспечивают экспериментальные возможности для дальнейшего изучения того, как протоны высвобождаются из PLS на Р-сторону мембраны.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Российским Научным Фондом (грант № 19-14-00063).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой и какой-либо иной области.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье нет описания работ, проведенных авторами с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

Благодарности. Авторы благодарны Илье Олейникову за техническое содействие в изго-

товлении рисунка 10. Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам, особенно рецензенту 2 и рецензенту 3.

Примечание. Эта работа посвящена памяти профессора А.А. Константинова, выдающегося ученого, вдохновляющего коллеги, учителя и очень хорошего друга.

Работы по изучению влияния ионов цинка на активность цитохромоксидазы и образование мембранного потенциала были начаты в лаборатории А.А. Константинова в начале 2000-х годов. Влияние Zn^{2+} на митохондриальную цитохромоксидазу описано в работах А.А. Константинова и соавторов [24, 30], его вклад и достижения в этой области были высоко оценены, они мотивировали и вдохновляли нас в этой работе.

А.А. Константинов любил и науку и музыку и обогащал жизнь всех, с кем общался. Он сыграл большую роль в расшифровке механизма генерации мембранного потенциала цитохром с оксидазой, используя различные умные стратегии. Его мышление было ясным и критичным. Научные дискуссии с его участием были очень яркими и полезными.

Р.Б. Геннис выражает глубокую признательность и благодарность Саше за посещение его лаборатории в Урбане, штат Иллинойс (США) и дальнейшие продолжительные визиты. Он был желанным гостем у нас дома и мои дети его очень любили, у них тоже остались очень теплые воспоминания о Саше. Мы также разделяли общий интерес к фильмам и книгам. После его ухода в наших душах образовалась большая пустота, и его очень нам не хватает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/copper terminal oxidases, *Chem. Rev.*, **7**, 2889-2907.
2. Siletsky, S. A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **18**, 36-57.
3. 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, doi: 10.1134/S0006297919110130.
4. Wikstrom, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273.
5. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**, 660-669.
6. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguichi, H., et al. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **272**, 1136-1144.
7. Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome *c* oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*., *J. Mol. Biol.*, **321**, 329-339.
8. Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time resolved electrogenic intraprotein proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 9085-9090.
9. Siletsky, S. A., Pawate, A. S., Weiss, K., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2004) Transmembrane charge separation during the ferryl-oxo → oxidized transition in a non-pumping mutant of cytochrome *c* oxidase., *J. Biol. Chem.*, **279**, 52558-52565.
10. Han, D., Namslawer, A., Pawate, A. S., Morgan, J. E., Nagy, S., et al. (2006) Replacing Asn207 by aspartate at the neck of the D channel in the *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in decoupling the proton pump, *Biochemistry*, **45**, 14064-14074.
11. Siletsky, S. A., Zhu, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2010) Partial steps of charge translocation in the nonpumping N139L mutant of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase with a blocked D-channel, *Biochemistry*, **49**, 3060-3073, doi: 10.1021/bi901719e.
12. 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.
13. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
 14. Siletsky, S. A., Borisov, V. B., and Mamedov, M. D. (2017) Photosystem II and terminal respiratory oxidases: molecular machines operating in opposite directions, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **22**, 1379-1426.
 15. Shirey, K., Stover, K. R., Cleary, J., Hoang, N., and Hosler, J. (2016) Membrane-anchored cyclic peptides as effectors of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochemistry*, **55**, 2100-2111, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01368.
 16. Frederickson, C. J., and Bush, A. I. (2001) Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects, *Biometals*, **14**, 353-366, doi: 10.1023/a:1012934207456.
 17. Fudge, D. H., Black, R., Son, L., LeJeune, K., and Qin, Y. (2018) Optical recording of Zn^{2+} dynamics in the mitochondrial matrix and intermembrane space with the GZnP2 sensor, *ACS Chem. Biol.*, **13**, 1897-1905, doi: 10.1021/acscchembio.8b00319.
 18. Sheline, C. T., Behrens, M. M., and Choi, D. W. (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis, *J. Neurosci.*, **20**, 3139-3146.
 19. Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **277**, 10064-10072, doi: 10.1074/jbc.M108264200.
 20. Sharpley, M. S., and Hirst, J. (2006) The inhibition of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) by Zn^{2+} , *J. Biol. Chem.*, **281**, 34803-34809, doi: 10.1074/jbc.M607389200.
 21. Link, T. A., and von Jagow, G. (1995) Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial *bc1* complex by blocking a protonatable group, *J. Biol. Chem.*, **270**, 25001-25006, doi: 10.1074/jbc.270.42.25001.
 22. Schulte, M., Mattay, D., Kriegel, S., Hellwig, P., and Friedrich, T. (2014) Inhibition of *Escherichia coli* respiratory complex I by Zn^{2+} , *Biochemistry*, **53**, 6332-6339, doi: 10.1021/bi5009276.
 23. Mills, D. A., Schmidt, B., Hiser, C., Westley, E., and Ferguson-Miller, S. (2002) Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome *c* oxidase by zinc, *J. Biol. Chem.*, **277**, 14894-14901.
 24. Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2005) Zinc ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 128-136.
 25. Lee, H. J., and Adelman, P. (2013) The heme-copper oxidase superfamily shares a Zn^{2+} -binding motif at the entrance to a proton pathway, *FEBS Lett.*, **587**, 770-774, doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.069.
 26. Aagaard, A., and Brzezinski, P. (2001) Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome *c* oxidase by oxygen, *FEBS Lett.*, **494**, 157-160.
 27. Francia, F., Giachini, L., Boscherini, F., Venturoli, G., Capitanio, G., et al. (2007) The inhibitory binding site(s) of Zn^{2+} in cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **581**, 611-616.
 28. Kannt, A., Ostermann, T., Muller, H., and Ruitenber, M. (2001) Zn^{2+} binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation, *FEBS Lett.*, **503**, 142-146.
 29. Nicholls, P., and Singh, A. P. (1988) Effect of zinc on proteoliposomal cytochrome oxidase. *Life Sci. Adv. (Biochemistry, Delhi)*, **7**, 321-326.
 30. Vygodina, T. V., Zakirzyanova, W., and Konstantinov, A. A. (2008) Inhibition of membrane-bound cytochrome *c* oxidase by zinc ions: High-affinity Zn^{2+} -binding site at the P-side of the membrane, *FEBS Lett.*, **582**, 4158-4162.
 31. Faxen, K., Salomonsson, L., Adelman, P., and Brzezinski, P. (2006) Inhibition of proton pumping by zinc ions during specific reaction steps in cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 388-394.
 32. Mitchell, D. M., and Gennis, R. B. (1995) Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni^{2+} -NTA affinity chromatography, *FEBS Lett.*, **368**, 148-150.
 33. 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.
 34. Siletsky, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., et al. (1999) Time-resolved generation of membrane potential by *ba3* cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear centre, *FEBS Lett.*, **457**, 98-102.
 35. Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Konstantinov, A. A. (1999) A cytochrome *bb'*-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168, *J. Biol. Chem.*, **274**, 32810-32817.
 36. Siletsky, S. A., Belevich, I., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovskiy, M. I. (2009) Time-resolved $O_H \rightarrow E_H$ transition of the aberrant *ba3* oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 201-205.
 37. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovskiy, M. I. (2011) Time-resolved single-turnover of *caa3* oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.05.006.
 38. Siletsky, S. A., Zaspas, A. A., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2014) Microsecond time-resolved absorption spectroscopy used to study CO compounds of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **9**, e95617, doi: 10.1371/journal.pone.0095617.
 39. Siletsky, S. A., Rappaport, F., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2016) Evidence for fast electron transfer between the high-spin haems in cytochrome *bd-I* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **11**, e0155186, doi: 10.1371/journal.pone.0155186.
 40. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324.
 41. Zaslavsky, D., Kaulen, A., Smirnova, I. A., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389-393.
 42. Zaslavsky, D. L., Smirnova, I. A., Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Millett, F., and Konstantinov, A. A. (1995) Rapid kinetics of membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase with the photoactive Ru(II)-tris(bipyridyl) derivative of cytochrome *c* as electron donor, *FEBS Lett.*, **359**, 27-30.
 43. Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovskiy, M. I. (2007) Time-resolved single-turnover of *ba3* oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383-1392, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.09.010.
 44. Siletsky, S. A., Belevich, I., Soulimane, T., Verkhovskiy, M. I., and Wikstrom, M. (2013) The fifth electron in the

- fully reduced *caa(3)* from *Thermus thermophilus* is competent in proton pumping, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1-9, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.013.
45. Kalaidzidis, Y. L., Gavrilov, A. V., Zaitsev, P. V., Korolev, E. V., and Kalaidzidis, A. L. (1997) PLUK- an environment for software development, *Progr. Comp. Soft.*, **23**, 206-211.
 46. Mamedov, M. D., Tyunyatkina, A. A., Siletsky, S. A., and Semenov, A. Y. (2006) Voltage changes involving photosystem II quinone-iron complex turnover, *Eur. Biophys. J.*, **35**, 647-654.
 47. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
 48. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.09.365.
 49. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikstrom, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by *ba3* cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and OH states, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.007.
 50. Medvedev, D. M., Medvedev, E. S., Kotelnikov, A. I., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Analysis of the kinetics of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection., *Biochim. Biophys. Acta*, **1710**, 47-56.
 51. Siletsky, S. A., Han, D., Brand, S., Morgan, J. E., Fabian, M., et al. (2006) Single-electron photoreduction of the P_M intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1122-1132, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.003.
 52. 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.
 53. Sugitani, R., and Stuchebrukhov, A. A. (2009) Molecular dynamics simulation of water in cytochrome *c* oxidase reveals two water exit pathways and the mechanism of transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1140-1150.
 54. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Inoue, N., et al. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Science*, **280**, 1723-1729.
 55. Mills, D. A., and Ferguson-Miller, S. (2002) Influence of structure, pH and membrane potential on proton movement in cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 96-100.
 56. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Proton exit channels in bovine cytochrome *c* oxidase, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1999-2006, doi: 10.1021/jp0464371.
 57. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., et al. (2007) A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7881-7886.
 58. Qin, L., Mills, D. A., Hiser, C., Murphree, A. R., Garavito, M., et al. (2007) Crystallographic location and mutational analysis of Zn and Cd inhibitory sites and role of lipidic carboxylates in rescuing proton path mutants in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **46**, 6239-6248.
 59. Klishin, S. S., Junge, W., and Mulikidjanian, A. Y. (2002) Flash-induced turnover of the cytochrome *bc1* complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus*: binding of Zn²⁺ decelerates likewise the oxidation of cytochrome *b*, the reduction of cytochrome *c1* and the voltage generation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 177-182, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00250-x.
 60. Mulikidjanian, A. Y. (2005) Ubiquinol oxidation in the cytochrome *bc1* complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting, *Biochim. Biophys. Acta*, **1709**, 5-34, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.03.009.
 61. Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Paddock, M. L., Okamura, M. Y., and Feher, G. (2000) Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd²⁺ and Zn²⁺ in bacterial reaction centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1542-1547, doi: 10.1073/pnas.97.4.1542.

TIME-RESOLVED ELECTROMETRIC STUDY OF F→O TRANSITION IN CYTOCHROME *c* OXIDASE. THE EFFECT OF Zn²⁺ IONS ON THE POSITIVE SIDE OF THE MEMBRANE

S. A. Siletsky^{1*} and R. B. Gennis²

¹ *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Moscow State University,
119991 Moscow, Russia; E-mail: siletsky@belozersky.msu.ru*

² *Department of Biochemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801, USA*

The effect of Zn²⁺ on the P-side of proteoliposomes containing membrane-incorporated *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase was investigated by the time-resolved electrometrics following a single electron injection into the enzyme prepared in the F state. The wild-type enzyme was examined along with the two mutants, N139D and D132N. All obtained data indicate that the primary effect of Zn²⁺ added from the P-side of the membrane is slowing of the pumped proton release from the proton loading site (PLS) to the bulk aqueous phase on the P-side of the membrane. The results strongly suggest the presence of two pathways by which the pumped proton can exit the protein from the PLS and of two separate binding sites for Zn²⁺. A model is presented to explain the influence of Zn²⁺ on the kinetics of membrane-potential generation by the wild-type COX, as well as by the N139D and D132N mutants.

Keywords: cytochrome *c* oxidase, zinc ions, proteoliposomes, electrogenic, proton pump, cytochrome *aa*₃, *Rhodobacter sphaeroides*