

УДК 577.152.1

КАТАЛИТИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ (КОМПЛЕКСА I)

Обзор

© 1999 г. А.Д. Виноградов*, Э.В. Гаврикова, В.Г. Гривенникова,
Т.В. Жарова, Н.В. Захарова

Кафедра биохимии биологического факультета
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
119899 Москва, Воробьевы горы, МГУ; факс: (095)939-3955;
электронная почта: adv@biochem.bio.msu.su

Поступила в редакцию 15.07.98

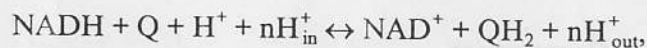
В обзоре, посвященном наиболее сложно организованному и наименее изученному комплексу дыхательной цепи млекопитающих (протон-транслоцирующая NADH:убихинон-оксидоредуктаза, Комплекс I), систематизированы качественные и количественные характеристики реакций, катализируемых препаратами фермента различной степени сложности – от интактных митохондрий до гомогенных фрагментов комплекса. Особое внимание уделено трудностям количественной интерпретации результатов измерения активности фермента. Детально описано современное состояние проблемы медленных обратимых изменений каталитической активности Комплекса I.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: NADH:убихинон-редуктаза; Комплекс I; дыхательная цепь; гистерезисное поведение ферментов; (митохондрии сердца быка).

1. ВВЕДЕНИЕ

Энергетическое обеспечение аэробных эукариотических клеток осуществляется, главным образом, окислительным фосфорилированием – окислением восстановительных эквивалентов (NADH, NADPH, убихинол) молекулярным кислородом, сопряженным с образованием АТФ из АДФ и неорганического фосфата. Этот процесс осуществляется сложным полиферментным ансамблем, локализованным во внутренней мембране митохондрий. Последний представлен пятью липопротеидными комплексами (рис. 1): NADH:убихинон-оксидоредуктазой (Комплекс I), сукцинат:убихинон-оксидоредуктазой (Комплекс II), убихинол:цитохром *c*-оксидоредуктазой (Комплекс III), цитохром *c*:кислород-оксидоредуктазой (Комплекс IV, цитохромоксидаза) и F₀ · F₁-АТФсинтетазой (Комплекс V). Окислительно-восстановительные реакции, катализируемые комплексами

I, III и IV, сопряжены с генерацией Δμ_{H⁺}, а Комплекс V (АТФ-синтетаза) использует свободную энергию Δμ_{H⁺} для образования АТФ. Комплекс I катализирует реакцию:



где Q и QH₂ – окисленный и восстановленный внутримембранный убихинон, а H⁺_{in} и H⁺_{out} – протоны, перенесенные из внутримитохондриального пространства наружу. По сравнению с другими Комплексы I – самый сложный и наименее изученный компонент дыхательной цепи.

В одном из исчерпывающих обзоров («NADH дегидрогеназа дыхательной цепи митохондрий»), опубликованном более четверти века тому назад, было сказано: «Благодаря применению сложных методов свойства этого необычного и интересного фермента теперь понятны, по крайней мере в общем виде; успешно завершились долго продолжавшиеся споры, и теперь ясно виден путь для решения оставшихся проблем...» [1]. Пятью годами позже в обзоре другого исследователя Комплекса I было отмечено, что «... трудно найти новый подход к проблеме, так как в этой области с 1963 г. не было найдено чего-либо существенно нового» [2]. Оба эти утверждения по-прежнему остаются в силе. Действительно, впечатляющие достижения последних лет в области изучения структур про-

Принятые сокращения: СМЧ – субмитохондриальные частицы; FP – трехсубъединичный железо-серный флавопротеин, выделяемый из Комплекса I; Q_n – гомологи убихинона, имеющие *n* изопреноидных остатков в положении 6 хинонового кольца; DV – 2,3-диметокси-5-метил-6-децилбензохинон; PV – 2,3-диметокси-5-метил-6-пентилбензохинон; NEM – N-этилмалеимид; ренн – 9,10-дигидро-4,5-дигидрокси-9,10-диоксо-2-антраценкарбоновая кислота; СССР – карбонилцианид-*m*-хлорофенилгидразон.

*Адресат для корреспонденции и запросов оттисков.

тон-транслоцирующих NADH:хинон-редуктаз млекопитающих [3], грибов [4] и прокариот [5] показали исключительную сложность этого фермента. Общая длина последовательностей аминокислот в более чем 40 различных субъединицах Комплекса I млекопитающих превосходит суммарную аминокислотную последовательность всех белков прокариотической рибосомы [3]. Фермент содержит около 10 различных редокс-компонентов: FMN [6], 5–7 железо-серных кластеров [7–10] и, по крайней мере, два типа связанного убихинона [11]. Последовательность переноса электронов между компонентами фермента (от NADH до хинона-акцептора) неизвестна. Маловероятно, что на ключевой вопрос о том, как внутримолекулярные редокс-превращения фермента сопряжены с векторным переносом протона, будет получен ответ с той степенью детализации, как это уже сделано для Комплекса III [12, 13] и цитохромоксидазы [14, 15].

Обзоры, опубликованные в последнее время, были посвящены, главным образом, структуре фермента [3–5], свойствам железо-серных кластеров [10], возможным механизмам транслокации протонов [16] и сравнительной молекулярной биологии фермента [3, 17]. По нашему мнению, какими бы мощными ни были приемы современной молекулярной биологии, знание каталитических свойств фермента необходимо для понимания молекулярного механизма его функционирования и физиологического регулирования.

В настоящем обзоре мы попытались обобщить сведения о каталитических свойствах фермента. Особое внимание уделено описанию необычного гистерезисного поведения митохондриального Комплекса I.

Вопросы, связанные с деталями структурной организации этого огромного «фермента», сравнительной биохимией NADH-убихинон оксидоредуктаз из разных источников, последовательностью внутримолекулярного переноса электронов между отдельными редокс-центрами комплекса и молекулярным механизмом векторной транслокации протонов остаются за рамками настоящего изложения. Мы планируем обсудить эти проблемы в другом готовящемся к публикации обзоре.

О самых последних достижениях в изучении NADH:убихинон-оксидоредуктазы читатель сможет узнать в вышедшем недавно специальном выпуске журнала *Biochimica et Biophysica Acta* [18]. Значительная часть предлагаемого обзора опубликована в этом издании [19].

2. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗЫ В СОСТАВЕ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ

На рис. 1 схематически представлено (как это принято в учебниках) строение дыхательной цепи млекопитающих, состоящей из 5 индивидуальных

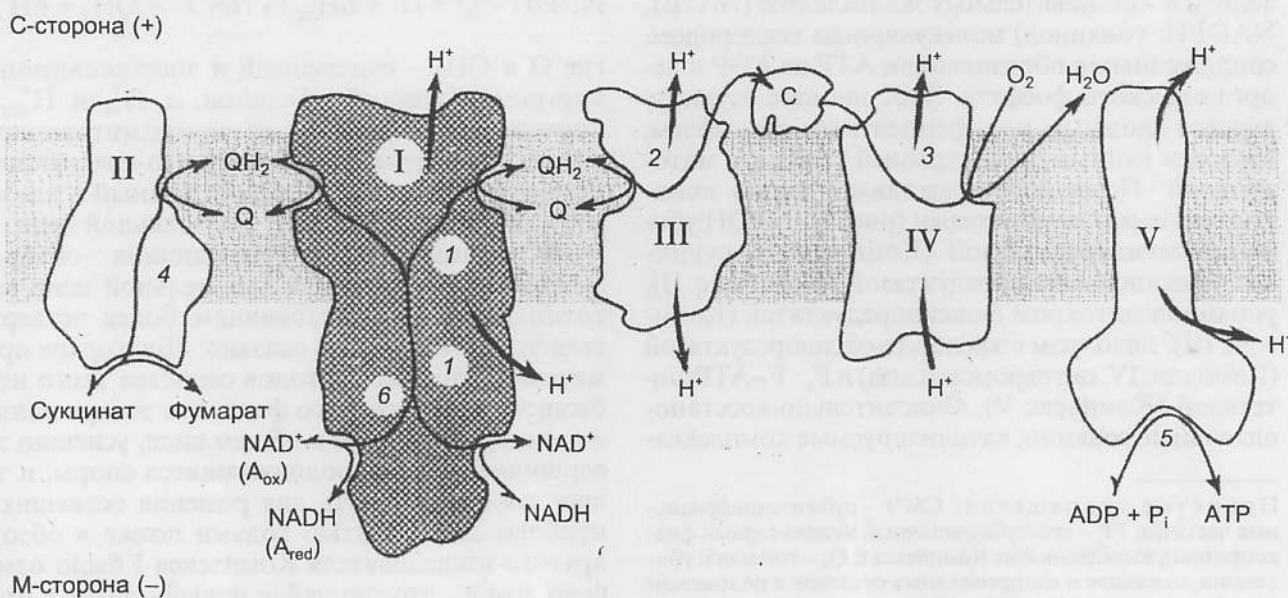


Рис. 1. Схематическое представление согласованной работы Комплекса I (на рисунке заштрихован) в составе внутренней мембраны митохондрий. Жирными стрелками показаны пути переноса электронов и трансмембранного переноса протонов. Римскими цифрами обозначены комплексы дыхательной цепи в соответствии с общепринятой номенклатурой [20]. Цифры в кружках над стрелками соответствуют номерам реакций в третьей колонке табл. 1

комплексов (I–V, согласно номенклатуре школы Грина [20]). Комплексы II и III–V вовлечены (или не вовлечены) в реакции, катализируемые собственно Комплексом I, в зависимости от того, о какой реакции идет речь. В табл. 1 приведены некоторые свойства «полной» NADH оксидазы, а также парциальные реакции, катализируемые Комплексом I либо в составе внутренней мембраны митохондрий, либо упрощенными препаратами различной степени сложности. Важно подчеркнуть, что для всех реакций, в которых происходит окисление или восстановление естественного акцептора электронов – убинона (реакции 1–3, 6–10; табл. 1), характерно аномальное кинетическое поведение. Детальное описание этих аномалий дано в разделе 4.

В табл. 1 и 2 приведены характеристики полностью активированных препаратов комплекса I.

2.1. Реакции

2.1.1. NADH-оксидазная реакция. Окисление внутримитохондриального NADH молекулярным кислородом протекает в результате последовательного функционирования трех индивидуальных комплексов (I, III и IV; рис. 1). Число оборотов Комплекса I в составе дыхательной цепи полностью разобщенных субмитохондриальных частиц (СМЧ) при 25° составляет $\approx 1 \cdot 10^4 \text{ мин}^{-1}$, принимая их NADH-оксидазную активность равной $\approx 1 \text{ мкмоль NADH}$, окисленного за 1 мин 1 мг белка, а содержание фермента в мембранах СМЧ равным 0,1–0,15 нмоль на 1 мг белка. При стационарном аэробном (сопряженном или разобщенном) окислении NADH железо-серные кластеры Комплекса I почти полностью восстановлены [41]. Это свидетельствует о том, что ре-

Таблица 1. Реакции, катализируемые препаратами NADH:убихинон-редуктазы митохондрий сердца быка различной степени очистки

1	2	3	4	5	6
1	NADH-оксидаза	$\begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow & \rightarrow \\ 1 \rightarrow 2 \rightarrow 3 \end{matrix}$	Интактные митохондрии; СМЧ	Ротенон; антимицин А; цианид	1,00 ^в
2	NADH:цитохром с-редуктаза	$\begin{matrix} \rightarrow & \rightarrow \\ 1 \rightarrow 2 \end{matrix}$	Изолированная NADH:цитохром с-редуктаза	Ротенон; антимицин А; миксотиазол	0,04
3	NADH:убихинон-редуктаза	\rightarrow 1	Интактные митохондрии; СМЧ; Комплекс I	Ротенон	1,00
4	NADH:искусственный акцептор-редуктаза: а) феррицианид; б) гексааминорутений (III); в) O ₂ (генерация супероксида) Г	\rightarrow 6	СМЧ; Комплекс I; NADH-дегидрогеназы Типа 1 и Типа 2 Д	Нет	9,00 10,00
5	NADH:ацилпиридин-NAD ⁺ (Трансгидрогеназа)	\rightarrow 6 (?)	СМЧ; Комплекс I; NADH-дегидрогеназы Типа 1 и Типа 2;	Нет	0,005 1,30
6	NADH:фумарат-оксидоредуктаза	$\begin{matrix} \rightarrow & \leftarrow \\ 1 \rightarrow 4 \end{matrix}$	СМЧ	Ротенон; все ингибиторы Комплекса II	0,015

1	2	3	4	5	6
7	Обратный перенос электронов: а) АТР-зависимое восстановление NAD ⁺ сукцинатом	→ ← 4 → 1 ← сопряженные с 5	Интakтные митохондрии; сопряженные СМЧ в присутствии ингибиторов убихинол-оксидазы	Ротенон; все ингибиторы Комплекса II; ингибиторы F ₀ -F ₁ -АТРазы; разобшители	0,25
	б) АТР-зависимая ротенон-чувствительная феррицианид-редуктаза	→ ← 4 → 6 ← сопряженные с 5	Сопряженные СМЧ	Те же, что и в 7а	0,27
	в) восстановление NAD ⁺ , поддерживаемое окислением сукцината (Δμ _{H⁺} -зависимая убихинол:NAD ⁺ -оксидоредуктаза; аэробный обратный перенос электронов)	← 1 сопряженные с → → → 4 → 2 → 3	Интakтные митохондрии; сопряженные СМЧ	Те же, что и в 7а, за исключением ингибиторов F ₀ -F ₁ -АТРазы	0,25

^а Стрелки → и ← над цифрами обозначают прямую и обратную реакции соответственно. Окисление NADH, сукцината, убихинола и цитохрома и синтез АТР рассматриваются как прямые реакции.

^б В список специфических ингибиторов, действующих в Q-связывающем участке Комплекса I включен только ротенон. Известно более 10 других ротенон-подобных ингибиторов (см. [21–25]). Реин [26, 27] и недавно открытый ингибитор АDP-рибоза [28] являются конкурентными по отношению к NADH ингибиторами, предполагается, что все активности с NADH в качестве субстрата чувствительны к реину и АDP-рибозе.

^в NADH-оксидаза (два электрон-эквивалента), катализируемая полностью разобшенными AS-СМЧ при 25° С (рН 8,0) принята за условную единицу (1,00). Это соответствует обычно определяемой в нашей лаборатории средней специфической активности, равной 1 мкмоль NADH, окисленному за 1 мин 1 мг белка [29]. Относительные значения скоростей, приведенные в этом столбце, следует рассматривать как приблизительные. Истинные значения (± 5–20%) зависят от множества факторов: концентрации ионов в среде измерения активности, дыхательного контроля препарата и т. д. Относительные активности указанных препаратов измерены в оптимальных условиях.

^г Аэробное окисление NADH, наблюдаемое в отсутствие добавленных акцепторов электронов (NADH-дегидрогеназы) или в присутствии ротенона или антимицина А, или миксотиазола, или цианида (СМЧ, Комплекс I).

^д Дегидрогеназы Типа 1, ферменты с высокой молекулярной массой, солюбилизованные из мембран обработкой детергентами или фосфолипазой [30–35]. Препараты свободны от фосфолипидов и убихинона и в отличие от Комплекса I не чувствительны к ротенону либо из-за модификации препаратов во время выделения, либо из-за потери некоторых субъединиц. Дегидрогеназа Типа 2, трехсубъединичный железо-серный флавопротеин с низкой молекулярной массой, катализирующий окисление NADH искусственными акцепторами электронов [36–38]. Фермент, очевидно, является модифицированным фрагментом Комплекса I или дегидрогеназ Типа 1.

акция, катализируемая собственно Комплексом I, не является скоростью-лимитирующей стадией в процессе окисления NADH дыхательной цепью. Максимальная скорость ротенон-чувствительного окисления NADH добавленным водорастворимым гомологом природного убихинона (Q₁) в составе СМЧ близка или немного меньше скорости NADH-оксидазной реакции. Следовательно, можно считать, что окисление восстановленного Комплекса I эндогенным убихиноном, по-видимому, определяет скорость суммарной NADH-оксидазной реакции.

Обработка некоторых препаратов СМЧ олигомицином, специфическим ингибитором протон-проводящей части АТРсинтетазы (F₀) индуци-

рует состояние «дыхательного контроля»: сильное торможение NADH- и сукцинат-оксидазных активностей, которое полностью снимается разобшителями [42]. СМЧ, стандартно получаемые в нашей лаборатории, имеют индуцированный олигомицином дыхательный контроль при окислении NADH, равный 5–10, в зависимости от качества препаратов тяжелых митохондрий сердца быка, используемых для получения СМЧ.

NADH-оксидаза сопряженных олигомицином СМЧ на сегодняшний день является единственной модельной реакцией для изучения Комплекса I в условиях, когда фермент работает в качестве протон-транслоцирующего преобразователя энергии.

2.1.2. NADH:цитохром *c*-оксидоредуктазная реакция. Эта активность требует одновременно функционирования Комплексов I и III, и ее можно обнаружить только в препаратах, полученных в результате обработки мембран митохондрий или СМЧ детергентами [43]. Цитохром *c* находится на внешней поверхности внутренней мембраны митохондрий (межмембранное пространство интактных митохондрий), и «вывернутые» СМЧ не катализируют антимицин А-чувствительную NADH:цитохром *c*-редуктазную реакцию. Эта реакция, однако, наблюдается при использовании классического препарата внутренней мембраны митохондрий (препарат Кейлина-Хартри) [44]. NADH-оксидазная активность этих препаратов увеличивается в 2–3 раза при добавлении цитохрома *c* [45]. Поскольку внутренняя мембрана митохондрий не проницаема для NADH, антимицин А-чувствительную NADH:цитохром *c*-редуктазную активность можно рассматривать как меру «незамкнутости» мембранных фрагментов, присутствующих в том или ином препарате СМЧ. Антимицин А-чувствительную NADH:цитохром *c*-редуктазу следует отличать от нечувствительной к ингибитору NADH:цитохром *c*-редуктазной активности, катализируемой некоторыми растворимыми препаратами NADH-дегидрогеназы [30–38]. Последние представляют собой фрагменты интактного Комплекса I, и в реакциях, катализируемых этими препаратами, цитохром *c* выступает в роли искусственного акцептора электронов (см. раздел 2.1.4 *a*).

2.1.3. NADH:убихинон-оксидоредуктазная реакция. Природный убихинон (Q_{10}) не растворим в воде. Для регистрации «минимальной» естественной реакции Комплекса I в качестве акцепторов электронов обычно используют его искусственные гомологи (Q_0 , Q_1 , Q_2) или аналоги (PB, DB, дурухинон) [46, 47]. Окисление NADH искусственными хинонами-акцепторами в интактных митохондриях [48], липосомах, содержащих Комплекс I [49], и СМЧ сопряжено с векторной транслокацией протонов [50].

Зависимости начальных скоростей реакции от концентрации хинона-акцептора как для препаратов изолированного очищенного, так и для мембраносвязанного Комплекса I весьма сложны, и их интерпретация далеко не проста по ряду причин. Во-первых, неизвестно, происходит ли реакция между компонентом-донором электронов и добавленным акцептором в результате специфического связывания добавленного хинона в «активном центре» фермента. При стационарном окислении NADH добавленным хиноном может происходить либо окисление эндогенного восстановленного Q_{10} (СМЧ), либо

окисление прочно связанного убихинола (Комплекс I), либо обе реакции. Во-вторых, в зависимости от концентрации и химической природы хинона, используемого в качестве акцептора, значительная доля общей реакции часто оказывается нечувствительной к ротенону (специфическому ингибитору Комплекса I). В «полной» (естественной) NADH-оксидазной реакции ротенон-нечувствительная составляющая не превышает 1% (эта остаточная активность, по крайней мере, частично обусловлена прямым взаимодействием кислорода с одним из редокс-компонентов фермента). Ротенон-нечувствительная активность, наблюдаемая в присутствии добавленного хинона, линейно зависит от концентрации (в пределах растворимости), таким образом, реальные кинетические параметры ротенон-чувствительной реакции (K_m , V_{max}) нельзя получить путем простого вычитания ротенон-нечувствительной составляющей. Дополнительные сложности измерения NADH: убихинон-редуктазной реакции обусловлены сильной разницей в зависимостях ротенон-чувствительной и ротенон-нечувствительной реакций от температуры. Например, в присутствии 90 мкМ Q_1 при 20° окисление NADH, катализируемое изолированным Комплексом I, только на 35% чувствительно к ротенону, а при 38° реакция чувствительна к ротенону на 92% (суммарные скорости окисления NADH при этих температурах составляют 0,34 и 2,8 мкмоль в мин на 1 мг белка соответственно).

Наконец, третья сложность качественной и количественной интерпретации NADH:хинон-редуктазных реакций связана с тем, что схема, изображенная на рис. 1, демонстрирует функционирование дыхательной цепи в весьма упрощенном виде. Ряд наблюдений позволяет предположить существование прямого взаимодействия Комплексов I и III в мембране митохондрий или СМЧ [51, 52]. Естественная убихинон-редуктазная реакция может быть результатом согласованного одноэлектронного восстановления Q (или его свободнорадикальной формы Q^{\bullet}) собственно дегидрогеназой с образованием убисемихинона (или убихинола) и цитохромом *b* в центре *i* Комплекса III, который поставляет второй электрон для полного двуэлектронного восстановления исходного хинона до хинола. Именно такой механизм был постулирован в первоначальной версии Q-цикла Митчелом [53]. Частичное торможение NADH:хинон-редуктазной активности [54, 55] некоторыми ингибиторами Комплекса III хорошо согласуется с таким предположением. Правда, такое торможение может быть также обусловлено структурным подобием участков связывания убихинона/убихинола в Комплексах I и III [55, 56].

В связи с возросшим интересом к изменениям активности Комплекса I при различных патологических состояниях [21, 57] недавно были предложены непрямые методы оценки NADH:убихинон-редуктазной активности, основанные на вычислениях [58, 59]. Следует однако подчеркнуть, что надежное количественное измерение естественной активности Комплекса I – проблема, требующая специальных исследований.

2.1.4. Окисление NADH искусственными акцепторами.

а) *Феррицианид-редуктазная реакция.* СМЧ, Комплекс I, а также NADH-дегидрогеназы 1 и 2 (см. раздел 2.2. Препараты) катализируют быстрое окисление NADH феррицианидом. Этот одноэлектронный акцептор широко использовался в многочисленных ранних работах по выделению и очистке фермента [60]. NADH:феррицианид-редуктазная реакция не сопряжена с векторным переносом протонов и представляется как искусственный шунт. Не известно, какой конкретный компонент фермента передает электроны на феррицианид. Есть основания полагать, что в качестве такого компонента служит FMN, так как феррицианид-редуктазная активность характерна для небольшого фрагмента Комплекса I – дегидрогеназы Типа 2 (FP, флавопротеин) [38]. Этот фрагмент содержит только три субъединицы из 43 и только два железо-серных кластера со среднеточечными потенциалами -410 и -465 мВ [61]; последние не восстанавливаются в присутствии NADH. Кинетические характеристики NADH:феррицианид-редуктазной реакции качественно различаются для препаратов различной степени очистки. Для СМЧ и Комплекса I наблюдается сильное торможение реакции избытком субстрата (NADH), и стандартная зависимость начальной скорости реакции от концентрации NADH при любой фиксированной концентрации феррицианида выглядит как колоколообразная кривая, положение максимума на которой зависит от концентрации акцептора [62]. Подобное поведение можно объяснить существованием конкуренции между феррицианидом и NADH за один и тот же редокс-компонент (предположительно FMN), расположенный в глубокой щели, формируемой четвертичной структурой белка [62]. Для очищенного растворимого FP крутизна этих кривых слабо выражена [63]. Числа оборотов фермента, рассчитанные на основе содержания FMN в FP, примерно в 10 раз меньше, чем у исходного Комплекса I или СМЧ [63]. Специфическая активность NADH:феррицианид-редуктазы, катализируемой FP, значительно увеличивается в присутствии гуанидин-хлорида [64]. Следует отметить, что сведения о числе оборотов NADH:феррици-

анид-редуктазной реакции являются противоречивыми вследствие чрезвычайных сложностей, возникающих при попытках надежно экстраполировать экспериментальные определяемые скорости к значению V_{max} . Реальные данные имеют вид серии колоколообразных кривых, которые не поддаются надежной аппроксимации гиперболами в любых диапазонах концентраций субстрата и акцептора. Стоит также отметить, что при концентрациях акцептора порядка миллимолей наблюдается существенное неферментативное окисление NADH феррицианидом.

б) *Гексааминорутений (III)-редуктазная реакция* [40, 65]. Гексааминорутений (III) – высокоэффективный акцептор электронов для изолированного Комплекса I и его фрагментов, а также для фермента в составе вывернутых СМЧ [40]. Реакция не чувствительна к ротенону и не сопряжена с транслокацией протонов. В широком диапазоне концентраций ни NADH, ни акцептор электронов не являются ингибиторами реакций. Для СМЧ или Комплекса I графики двойных обратных координат ($1/v-1/NADH$) при разных концентрациях акцептора дают серии прямых, пересекающихся в третьем квадранте, что указывает на механизм реакции, согласно которому комплекс восстановленный фермент-NAD⁺ окисляется гексааминорутением до диссоциации NAD⁺ при участии единственного редокс-центра фермента.

Дегидрогеназа Типа 2 (FP) также активно реагирует с этим акцептором [65]. Гексааминорутений является единственным акцептором электронов, который выявляет одинаковые числа оборотов фермента, рассчитанные по содержанию FMN, в СМЧ, Комплексе I и FP. В отличие от реакции с феррицианидом гуанидин не стимулирует, а ингибирует NADH: гексааминорутений-редуктазную активность, катализируемую FP. Благодаря простоте количественной обработки кинетических данных, высокой реакционной способности по отношению к ферменту, отсутствию перекрытий спектров с NADH и неэнзиматической реакции, гексааминорутений, по нашему мнению, – наиболее подходящий искусственный акцептор для измерения удельной активности фермента при его очистке.

в) *Генерация супероксид-радикала.* Кислород, строго говоря, не является «искусственным» акцептором электронов. Прямое восстановление O₂ компонентами Комплекса I является, по-видимому, главным источником активных форм кислорода в митохондриях. В последнее время этому процессу уделяется особое внимание, так как полагают, что активные формы кислорода участвуют в повреждении митохондриальной ДНК, некоторых ферментов и мембран. Много

лет назад было показано, что в первом пункте сопряжения дыхательной цепи митохондрий в результате прямого восстановления кислорода происходит образование H_2O_2 [66]. O_2^{\bullet} (супероксид-анион) является стехиометрическим предшественником H_2O_2 , образующейся в митохондриях [67], и в физиологических условиях одноэлектронное восстановление кислорода некоторыми компонентами дыхательной цепи достигает 2% от его общего потребления [68]. В СМЧ, обработанных антимицином А и ротеноном [69], наблюдается чувствительное к супероксиддисмутазе (КФ 1.15.1.1), NADH- и NADPH-зависимое окисление адреналина или восстановление ацетилированного цитохрома *c* со специфической активностью порядка 1 нмоль O_2^{\bullet} в мин на 1 мг белка при 30°. Место образования супероксида в Комплексе I не известно: потенциально все редокс-компоненты фермента: FMN [70], железо-серные кластеры [71] и убисемихинон [72] в аэробных условиях могут генерировать супероксид-радикал. В обработанных антимицином А СМЧ наблюдается двухфазный эффект ротенона: генерация O_2^{\bullet} увеличивается при концентрации ингибитора, необходимой для торможения NADH-оксидазы (0,3 нмоль на 1 мг белка), при дальнейшем увеличении концентрации ингибитора скорость реакции снижается [69]. Образование супероксид-радикала как СМЧ, так и Комплексом I в присутствии NADH и NADPH на графиках в двойных обратных координатах (1/скорость – 1/концентрация нуклеотида) имеет бифазный характер, что указывает на наличие двух кажущихся K_m для субстратов [73, 74]. Описана также генерация O_2^{\bullet} в ходе чувствительного к ротенону и разобщителю АТФ-зависимого обратного переноса электронов от убихинола к одному из компонентов Комплекса I [66, 75]. Было показано, что скорость этой энергозависимой реакции составляет около 20% от скорости реакции, наблюдаемой в присутствии NADH и ротенона; генерация O_2^{\bullet} в присутствии сукцината и АТФ возрастала (в 4–5 раз) при добавлении NAD^+ [75]. Авторы этих наблюдений предположили, что связанный NAD^{\bullet} -радикал является источником супероксида в реакции обратного переноса электронов, как это было показано для других NAD-зависимых дегидрогеназ [76, 77].

Следует отметить, что специфическая активность Комплекса I в реакции генерации супероксид-радикала примерно на 3 порядка ниже, чем в NADH:убихинон-редуктазной реакции или в NADH-оксидазе (СМЧ), и эта реакция конечно же не пригодна для определения активности фермента. Тем не менее O_2^{\bullet} и H_2O_2 (продукт супероксиддисмутазной реакции) потенциально

могут участвовать во многих физиологических и патофизиологических процессах, таких как внутриклеточная сигнализация или окислительный стресс [78, 79]. Если генерацию супероксида рассматривать как «опасную утечку», то функциональная значимость множества субъединиц фермента, прямо не вовлеченных в реакции переноса электронов и протонов, становится очевидной: они служат в качестве защитной «обертки» для низкопотенциальных редокс-компонентов, предотвращая их термодинамически благоприятное прямое взаимодействие с кислородом. Такое предположение позволяет объяснить, почему ни один из искусственных акцепторов, взаимодействующих с ферментом на «входе» или «выходе», не реагирует с промежуточными компонентами: система хорошо защищена! Генерация супероксида СМЧ или Комплексом I существенно отличается от таковой, катализируемой растворимым FP в аэробной ротенон-нечувствительной NADH:хинон-редуктазной реакции [80].

2.1.5. Трансгидрогеназная и другие NADP⁺/NADPH-зависимые реакции. Внутренняя мембрана митохондрий содержит два фермента, способных катализировать трансгидрогеназную реакцию. Первый – протон-транслоцирующая трансгидрогеназа, не содержащая никаких редокс-активных простетических групп (КФ 1.6.1.1) и катализирующая прямой перенос гидрид-иона между водородом в 4А положении NADH и водородом в 4В положении NADPH. Реакция сопряжена с векторным переносом H^+ [81]. В дополнение к активностям, описанным в предыдущем разделе, Комплекс I и ряд его более простых препаратов также катализируют трансгидрогеназную реакцию: 4В стереоспецифический FMN-зависимый [³H]NADH- H_2O обмен [82, 83] и окисление NADH ацетилпиридин-NAD⁺ [64]. Уместно отметить, что трансгидрогеназная активность не является общим свойством NADH (NADPH)-окисляющих ферментов; например, ДТ-диафораза (NADH(NADPH):хинон-оксидоредуктаза (КФ 1.6.99.2)), гомодимерный FAD-содержащий фермент, катализирует окисление как NADPH, так и NADH [84, 85], но не способна катализировать трансгидрогеназную активность. Способность Комплекса I к катализу трансгидрогеназной реакции позволяет предположить, что редокс-потенциал FMN близок к потенциалу пары пиридиннуклеотидов (субстрата и продукта). Если бы восстановление флавина в присутствии NADH было термодинамически необратимо, то значительный перепад редокс-потенциалов между восстановленным ферментом и окисленным пиридиннуклеотидом создавал бы серьезные ограничения для последую-

щего переноса электронов от фермента к нуклеотиду-субстрату. Действительно, среднеточечные редокс-потенциалы FMN, определенные для Комплекса I [86] и косвенно оцененные для FP [87], близки к потенциалу пары $NADH/NAD^+$.

СМЧ катализируют чувствительное к ротенону окисление $NADPH$ в условиях, исключающих функционирование трансгидрогеназы (КФ 1.6.11), со скоростями существенно меньшими, чем скорость окисления $NADH$, имеющей широкий pH-оптимум при pH 7,5–8,2, $NADPH$ -дегидрогеназная активность Комплекса I возрастает при кислых pH (ниже 6,0). $NADH \rightarrow$ ацетилпиридиннуклеотид-редуктазная активность показана для препаратов СМЧ, Комплекса I, а также для дегидрогеназ Типа 1 и Типа 2 [64, 90]. Фермент Типа 2 катализирует $NADPH:NAD^+$ -трансгидрогеназную реакцию, но не $NADH:NADP^+$ - или $NADPH:NADP^+$ -трансгидрогеназные активности [64]. Прочно сопряженные СМЧ катализируют энергозависимое, поддерживаемое окислением сукцината, чувствительное к ротенону, стереоспецифическое восстановление $[4B-^3H]NAD^+$ и $NADP^+$ [81, 88, 91] – реакции, которые, как полагают, являются простым обращением протон-транслоцирующей $NADH$:убихинон-редуктазной реакции (см. раздел 2.1.3). $NADPH$ восстанавливает FMN и железо-серные кластеры фермента. Различия в восстановлении некоторых Fe-S кластеров и в ингибировании окисления $NADH$ и $NADPH$ специфическим ингибитором пирицидином привели Албрахта и соавт. к модели гетеродимерного строения Комплекса I, согласно которой последний состоит из $NADH$ -специфического и $NADPH$ -специфического протомеров [92–94]. Совсем недавно эти же экспериментальные результаты были пересмотрены, и, согласно новой интерпретации тех же авторов, Комплекс I предстает мономером, несущим два FMN (и, возможно, два нуклеотидсвязывающих центра) [95]. Исследования $NADH$ - и $NADPH$ -индуцированного окисления липидов в СМЧ привели к заключению о том, что Комплекс I способен по-разному реагировать на поступление электронов от $NADH$ или $NADPH$ из-за различий в центрах связывания нуклеотидов [96].

Было показано, что большая субъединица FP (51 кДа)-фрагмента Комплекса I млекопитающих и бактерий, содержащая FMN и железо-серный кластер N-3, имеет единственный центр связывания $NADH$ [97–100]. С другой стороны, так как FP способен к трансгидрогеназной активности, было предположено, что FP несет в своем составе два центра связывания нуклеотидов: один для связывания $NADH$ и $NADPH$ при

их дегидрировании и второй для связывания второго нуклеотида при протекании трансгидрогеназной реакции [64]. Совсем недавно нами была предложена модель, согласно которой в Комплексе I существует два разных нуклеотидсвязывающих центра, функционирующих при протекании прямого и обратного переноса электронов [28]. Эта модель основывается на обнаружении «одностороннего» эффекта ADP-рибозы, которая, как было показано, конкурентно тормозит окисление $NADH$ в СМЧ, Комплексе I и FP и стимулирует энергозависимый поддерживаемый аэробным окислением сукцината обратный перенос электронов [28]. Интересно отметить, что эволюционно консервативный мотив в первичной структуре 51 кДа субъединицы фермента млекопитающих [3] и соответствующих ей субъединиц (*P.*) *denitrificans* [5] и (*N.*) *crassa* [101] считается наиболее вероятным участком связывания $NADH$. Кроме того, в составе 39 кДа субъединицы Комплекса I митохондрий сердца [3] и его гомологе, 40 кДа субъединице Комплекса I из митохондрий (*N.*) *crassa* [102], также обнаружены участки, характерные для центров связывания нуклеотидов.

Подводя итог, следует подчеркнуть, что вопросы о том, сколько центров связывания нуклеотидов имеет Комплекс I и (если их два или более), каковы их специфичность и взаимодействие (если таковое существует), требуют дальнейших экспериментальных исследований.

2.1.6. $NADH$:фумарат-оксидоредуктазная реакция. Поскольку среднеточечный редокс-потенциал пары сукцинат/фумарат ($\approx 0,00$ В) значительно более положителен, чем потенциал пары $NADH/NAD^+$ ($\approx -0,32$ В) [103], можно ожидать, что фумарат должен быть эффективным акцептором электронов при окислении $NADH$, конечно же при условии, что существует каталитический механизм, обеспечивающий достижение равновесия в этой реакции. Действительно, было показано, что в условиях, когда окисление убихинола блокировано, СМЧ способны катализировать $NADH$:фумарат-редуктазную реакцию, чувствительную ко всем ингибиторам Комплекса I и Комплекса II. В сопряженных СМЧ окисление $NADH$ фумаратом способно обеспечить синтез АТФ [104]. Удельная активность СМЧ млекопитающих в этой реакции очень низка (около 30 нмоль в мин на 1 мг белка при 25° в присутствии миксотиазола, что составляет $\approx 1,5\%$ от активности $NADH$:убихинон-редуктазы и сравнимо по величине с нечувствительной к ротенону индуцированной $NADH$ генерацией супероксида). Реакция не стимулируется разобщителями. Существуют по крайней мере две причины, объясняющие такую низкую

активность. Во-первых, кинетические свойства сукцинатдегидрогеназы млекопитающих, обладающей фумарат-редуктазной активностью, эволюционно приспособлены для катализа в физиологически значимом направлении – окислении сукцината [105]. В связи с этим интересно, что сукцинатдегидрогеназа теряет свою активность при сильно отрицательных значениях редокс-потенциала – эффект, названный авторами «диод-подобным поведением» [106]. Во-вторых, в условиях стационарного протекания NADH:фумарат-редуктазной реакции внутримембранный убихинол полностью восстановлен. По нашим неопубликованным данным убихинол ингибирует активность NADH:убихинон-редуктазы. Это означает, что соотношение убихинон/убихинол в липидной фазе мембраны регулирует активности Комплекса I и II не только за счет снижения концентрации субстрата-акцептора электронов (Q), но также из-за торможения активности фермента продуктом реакции (QH₂) [107, 108].

2.1.7. Обратный перенос электронов. Обратимость реакций переноса электронов в первом пункте сопряжения дыхательной цепи обсуждается уже почти 40 лет с того времени, когда в лабораториях Чанса [109] и Клингенберга [110] независимо было показано, что добавление сукцината или α -глицерофосфата к митохондриям в состоянии 4 приводит к чувствительному к разобщителям восстановлению внутримитохондриальных пиридиннуклеотидов. Классические работы по этой теме суммированы в работах [111, 112]. Общие свойства этой реакции, в настоящее время широко используемой для изучения Комплекса I, а также при изучении обратимости протон-транслоцирующей F₀-F₁ АТФ синтетазы, кратко суммированы ниже.

а) АТФ-зависимое восстановление NAD⁺ сукцинатом. Как показано на схеме, представленной на рис. 1 и в табл. 1, полная реакция в СМЧ является результатом одновременного функционирования трех ферментных комплексов: Комплекса II, поставляющего электроны для восстановления убихинона, Комплекса V (обратимой F₀-F₁ АТФазы), генерирующего $\Delta\mu_{H^+}$, и Комплекса I, утилизирующего $\Delta\mu_{H^+}$ в убихинол:NAD⁺-редуктазной реакции, в условиях, когда убихинол-оксидазная активность блокирована ингибиторами Комплекса III или Комплекса IV. В отличие от активностей различных препаратов СМЧ в NADH:убихинон-редуктазной и NADH-оксидазных реакциях данные об активности АТФ-зависимого обратного переноса электронов, встречающиеся в литературе, сильно варьируют. Эти различия, очевидно, обусловлены различиями в протонных утечках для разных препаратов СМЧ [113] и, что не менее важно, необычными

кинетическими свойствами каждого из ферментов, участвующих в суммарной реакции. Хорошо известно, что сукцинатдегидрогеназа (Комплекс II) большинства препаратов СМЧ, по крайней мере частично, представлена ее деактивированной формой, прочно связанной с оксалоацетатом [114, 115]. Чтобы вытеснить прочно связанный оксалоацетат и достичь максимальной каталитической активности, перед измерением активности необходима длительная (10–30 мин) преинкубация фермента в присутствии либо субстрата (сукцината), либо конкурентного ингибитора (малоната) при относительно высокой температуре (20–30°) [114–116]. F₀-F₁ АТФазы в большинстве препаратов СМЧ также присутствует в виде неактивной связанной с комплексом ADP(Mg²⁺) формы и характеризуется наличием значительного лаг-периода в реакции гидролиза АТФ, даже в присутствии «кинетического» избытка добавленной АТФ-регенерирующей системы [117]. Для предотвращения накопления ингибитора реакции – ADP, для протекания АТФ гидролазной реакции обычно добавляют фосфоенолпируват и пируваткиназу (КФ 2.7.1.40) [118]. Большинство коммерческих препаратов пируваткиназы, однако, содержат примесь лактатдегидрогеназы (КФ 1.1.1.27). Этот фермент окисляет NADH, образованный в реакции АТФ-зависимого обратного переноса электронов, стехиометрическими количествами пирувата, образованного в пируваткиназной реакции. Таким образом, измеряемая скорость обратного переноса электронов может оказаться существенно заниженной. В большинстве препаратов СМЧ присутствует белок-ингибитор АТФазы [119]. Этот естественный компонент АТФсинтазы взаимодействует с фактором F₁ весьма нетривиальным, сильно зависящим от ионной силы, рН и времени, образом [120]. Кроме того, как будет описано в разделе 4, сам по себе Комплекс I обычно присутствует в деактивированной форме. Нам представляется очевидным, что многочисленные «аномалии» кинетики АТФ-зависимого обратного транспорта электронов, о которых сообщалось ранее [91, 121], были обусловлены неконтролируемым вкладом факторов, перечисленных выше. Мы полагаем, что для количественных исследований обратного переноса электронов наилучшим препаратом могут служить так называемые AS-СМЧ, которые не содержат белка-ингибитора АТФазы и частично дефицитны по фактору F₁ [122]. Эти частицы могут быть искусственно «сопряжены» либо субстехиометрическими количествами олигомицина [42] (для прослеживания АТФ-зависимых реакций), либо избытком антибиотика (для аэробных АТФ-независимых энерго-зависимых

реакций). В оптимальных условиях AS-СМЧ катализируют АТР-зависимый обратный перенос электронов со скоростями, составляющими примерно 25% от прямой NADH:убихинон-редуктазной или NADH-оксидазной активностей [29].

б) *АТР-зависимое восстановление феррицианида сукцинатом.* Эта реакция является вариантом предыдущей. Вместо NAD^+ в качестве конечного акцептора электронов, передаваемых от убихинола к низкопотенциальному редокс компоненту Комплекса I, в этой реакции используется феррицианид [66]. Так как АТР-зависимая сукцинат:феррицианид-редуктазная реакция в вывернутых СМЧ на 90% чувствительна к ротенону и разобшителям [29, 66], можно считать, что только Комплекс I реагирует с феррицианидом (0,5–1 мМ) со значительными скоростями. Общепринято, что феррицианид принимает электроны от того же компонента, что и в NADH:феррицианид-редуктазной реакции (предположительно с FMN).

с) *Аэробное восстановление NAD^+ или феррицианида, поддерживаемое окислением сукцината.* Несмотря на то, что эта реакция была первым экспериментальным доказательством обратимости в первом пункте сопряжения [109, 110], до недавнего времени она не была обнаружена в СМЧ [29]. В прочно сопряженных СМЧ окисление убихинола, образованного Комплексом II, создает $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ (при последовательном функционировании Комплекса III, цитохрома *c* и цитохром *c*-оксидазы), который может быть использован для обеспечения переноса электронов от убихинола на NAD^+ . Начальные скорости этой чувствительной к разобшителю и ротенону реакции те же, что и в случае, когда убихинол-оксидаза блокирована и $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$ образуется за счет гидролиза АТР [29]. Достигаемое в стационарном состоянии соотношение NADH/NAD^+ (как в интактных митохондриях [109–112]) в первом приближении определяется величиной стационарного $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$. Ситуация, однако, не так проста, как следовало бы ожидать, полагая, что Комплекс I катализирует быстрое уравнивание редокс-пар NADH/NAD^+ и Q/QH_2 с $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$. В стационарном состоянии соотношение NADH/NAD^+ можно увеличить добавлением низких концентраций ротенона [123]. Это наблюдение привело к предположению, что взаимодействие ротенона и Комплекса I зависит от $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$, а увеличение соотношения NADH/NAD^+ происходит из-за ингибирования окисления NADH несопряженной «субпопуляцией» СМЧ [123]. Детальная оценка сродства Комплекса I к ротенону не выявила разницы в сродстве сопряженных и разобшенных СМЧ к ингибитору; однако оказалось, что чувствительности прямого и обратного транс-

порта электронов к ротенону различаются примерно в 10 раз [124]. Весьма вероятно, что в катализе окисления NADH и восстановлении NAD^+ принимают участие различные центры связывания для убихинона (в прямой реакции) и убихинола (в обратной реакции), а ротенон связывается с этими двумя центрами с разным сродством. Это предположение подтверждается недавними наблюдениями об «одностороннем» действии АТР-рибозы (конкурентного ингибитора NADH-оксидазы), который подобно ротенону вызывает увеличение стационарного соотношения NADH/NAD^+ при аэробном обратном транспорте электронов, поддерживаемом окислением сукцината [28].

2.2. Препараты

2.2.1. **Митохондрии.** Изолированные митохондрии слишком сложны для изучения ферментативных свойств Комплекса I. Однако из-за резко возросшего интереса к медико-биологическим исследованиям в последние годы увеличилось количество публикаций, в которых в качестве критерия активности некоторых компонентов дыхательной цепи, в частности Комплекса I, измеряется дыхание митохондрий, изолированных из нормальных или патологических тканей. В связи с этим следует подчеркнуть, что интактные митохондрии непроницаемы для NADH и NAD^+ , и окисление субстратов цикла Кребса, добавленных к суспензии митохондрий, представляет собой чрезвычайно сложный процесс, который включает функционирование по крайней мере четырех различных ферментативных систем: переносчика/обменника субстратов, специфическую NAD^+ -зависимую дегидрогеназу, Комплекс I и терминальную убихинол-оксидазную часть дыхательной цепи. Таким образом, прямой анализ и интерпретация данных, имеющих отношение к функционированию Комплекса I в интактных митохондриях, представляются нам чрезвычайно сложной задачей.

2.2.2. **Субмитохондриальные частицы (СМЧ).** Наиболее «интактный» ротенон-чувствительный препарат NADH-оксидазы (или NADH:убихинон-редуктазы) – субмитохондриальные частицы, получаемые в результате обработки митохондрий ультразвуком. Описано много типов СМЧ, способных к окислению NADH, и их свойства рассмотрены в нескольких обзорах [45, 125, 126]. При изучении Комплекса I с использованием так называемых «вывернутых» СМЧ, лишенных ферментов цикла Кребса и барьеров проницаемости для NADH/NAD^+ , следует иметь в виду ряд обстоятельств, важных для интерпретации результатов.

Во-первых, некоторые препараты СМЧ представлены смесью «вывернутых» частиц, частиц с исходной ориентацией внутренней мембраны митохондрий, а также разомкнутых внутренних (а возможно, и внешних) мембран. При центрифугировании некоторых СМЧ в градиенте плотности сахарозы были выявлены две различающиеся по морфологии популяции мембран [127, 128]. Отсутствие латентной или атракtilат-чувствительной АТРазной активности в обеих фракциях препаратов ЭДТА-СМЧ или сходных с ними AS-СМЧ [127, 128], которые обычно используются в нашей лаборатории [29], делает маловероятным наличие существенной доли частиц с исходной (как в митохондриях) ориентацией мембраны. В замкнутых «вывернутых» СМЧ можно ожидать наличие субпопуляции с различной степенью дефицитности по F_1 -АТРазае (т. е. с разной протонной проводимостью через F_0 -каналы). Закон распределения для такой потенциально возможной гетерогенности не известен, и к кинетическому анализу любого мембраносвязанного фермента нужно относиться с большой осторожностью. Тем не менее стандартный кинетический анализ некоторых ферментов в составе СМЧ, таких как трансгидрогеназа [129, 130], F_0 - F_1 АТРаза [118] и Комплекс I [39, 131], не выявил каких-либо отклонений зависимостей скоростей реакций от концентраций субстратов от обычного Михаэлисовского типа, как этого можно было бы ожидать для кинетически гетерогенных систем. Другими словами, по крайней мере некоторые СМЧ ведут себя так же, как любой гомогенный фермент.

Во-вторых, по сравнению с интактными митохондриями большинство препаратов СМЧ «разобщены», по-видимому, из-за больших протонных утечек через F_0 - F_1 АТРаза, модифицированную в процессе получения. Поэтому в таких СМЧ Комплекс I так же, как и другие протон-транслоцирующие компоненты дыхательной цепи, обычно функционирует в искусственных условиях, т.е. в отсутствие $\Delta\bar{\mu}_H^+$.

В-третьих, хотя СМЧ и не катализируют со сколь-нибудь значительными скоростями (по сравнению со скоростью окисления NADH) NAD^+ -зависимое окисление субстратов цикла Кребса, большинство препаратов содержат следовые количества некоторых ферментов цикла Кребса, а также нуклеотиды. Так, например, по опыту нашей лаборатории, чрезвычайно трудно получить препарат СМЧ, полностью освобожденный от фумаразной и малатдегидрогеназной активностей. Эти «остаточные» активности могут серьезно затруднить интерпретацию экспериментальных данных, полученных в условиях, где один или несколько каталитических оборо-

тов примесных ферментов могут оказаться весьма существенными (например, при титровании редокс-компонентов Комплекса I с использованием пары сукцинат/фумарат в присутствии или отсутствии добавленных NAD^+ или NADH). Несмотря на эти недостатки, по нашему мнению, «прочно сопряженные» СМЧ, получаемые в результате обработки субстехиометрическим количеством (или избытком) олигомицина, как это было описано в наших работах [29], на сегодня служат наиболее подходящим препаратом для изучения механизма транслокации протонов в первом пункте сопряжения.

2.2.3. Комплекс I. Единственный очищенный препарат, способный катализировать ротенон-чувствительную NADH:убихинон-редуктазную реакцию с параметрами, сходными с СМЧ, — Комплекс I, метод получения которого был разработан более 30 лет назад [132]. Этот препарат представлен комплексом белков, фосфолипидов и детергента и слегка загрязнен убихинол:цитохром *c*-редуктазой (Комплекс III) и протон-транслоцирующей трансгидрогеназой. В строго определенных условиях диспергированный в водном растворе, содержащем добавленные фосфолипиды, Комплекс I функционирует как ротенон-чувствительная NADH:убихинон-редуктаза. Примечательно, что в X томе «Методов энзимологии», где был опубликован ставший классическим метод получения, Комплекс I был помещен в раздел, озаглавленный «Субмитохондриальные частицы» [133], а не в раздел, где было описано получение очищенных компонентов дыхательной цепи. В самом деле, до сих пор нет строгих доказательств того, что так называемый Комплекс I представляет собой минимальную структурно-функциональную единицу, способную катализировать ротенон-чувствительную NADH:убихинон-редуктазную активность. Было показано, что Комплекс I, встроенный в протеолипосомы, обладает протон-транслоцирующей активностью [49, 134]. Очень немного известно о структурной организации Комплекса I в составе мембраны митохондрий или очищенном дисперсном состоянии. На основании опытов по «сшиванию» отдельных субъединиц фермента и последующего анализа состава полипептидов после электрофореза в ПААГ в присутствии Ds-Na [2] были предложены модели взаимного расположения отдельных субъединиц в составе Комплекса I.

Методом электронной микроскопии показано, что Комплекс I, выделенный из (*N.*) *crassa*, имеет форму, напоминающую латинскую букву L. Одна «рука» соответствует части фермента, погруженной в матрикс, другая — соответствует части, экспонированной в водную фазу; послед-

няя отщепляется от мембраносвязанного комплекса под действием хаотропных агентов [135].

Комплекс I млекопитающих можно разделить на каталитически активный трехсубъединичный флавопротеин (FP), содержащий негемовое железо (см. ниже), каталитически инертную белковую фракцию, содержащую железосерные кластеры (IP), и гидрофобную фракцию (HP) [136]. Реконструкции каталитической активности при смешивании этих компонентов не происходит.

2.2.4. NADH-дегидрогеназа Типа 1. В литературе описано несколько препаратов так называемых высокомолекулярных растворимых NADH-дегидрогеназ Типа 1. Эти препараты можно получить в результате солюбилизации внутренних мембран митохондрий ([30] и литература, цитированная в этой работе). Высокомолекулярные препараты дегидрогеназы содержат FMN, негемовое железо и серу почти в тех же стехиометрических соотношениях, что и Комплекс I. Общим свойством всех NADH дегидрогеназ Типа 1, за исключением одной (см. ниже), является их способность катализировать окисление NADH многими искусственными акцепторами электронов (включая гомологи и аналоги убихинона) в ротенон-нечувствительных реакциях. Не ясно, связана ли потеря чувствительности к ротенону с потерей в процессе очистки каких-то полипептидов (по сравнению с исходными СМЧ или Комплексом I) или это обусловлено модификацией фермента при обработке детергентом или фосфолипазой. Недавно удалось расщепить Комплекс I сердца быка (с помощью диметилдодecilамина N-оксида) на два фрагмента, названных I α и I β [35]. Субкомплекс I α содержал около 20 субъединиц и имел NADH-дегидрогеназную активность, тогда как субкомплекс I β , представленный 15 субъединицами, не содержал никаких редокс-компонентов [35]. При использовании другого детергента (лаурилсаркозина) от Комплекса I можно отщепить небольшой фрагмент, содержащий 13 субъединиц (I Δ S) [137]. Как и множество других описанных ранее растворимых NADH-дегидрогеназ I Δ S катализирует ротенон-нечувствительную феррицианид- и хинон-редуктазную активности и при восстановлении демонстрирует спектры, сходные с Комплексом I [137].

Исключением среди множества растворимых дегидрогеназ Типа 1 (ND-1) является фермент, солюбилизованный тритоном X-100, не содержащий фосфолипидов и катализирующий ротенон-чувствительную хинон-редуктазную реакцию; смешивание этого препарата с Комплексом III приводило к реконструкции антимицин А-чувствительной NADH:цитохром c-ре-

дуктазы [33]. Дальнейшие исследования этого препарата не проведены; более того, Рейгану не удалось воспроизвести ротенон-чувствительное восстановление хинона, катализируемое препаратом этого фермента [49].

Недавно был предложен новый хроматографический способ очистки NADH:убихинон-редуктазы из препарата митохондрий, солюбилизованных додецилмальтозидом [138]. Полученный фермент был свободен от фосфолипидов и содержал все 43 субъединицы, обнаруженные в других препаратах. Ротенон-чувствительная NADH:децилубихинон-редуктазная активность гомогенного монодисперсного препарата фермента, измеренная при 30° в присутствии фосфатидилхолина, составляла 1,2 мкмоль NADH, окисленного за 1 мин 1 мг белка [138], что примерно равно специфической активности субмитохондриальных частиц [19]. Другими словами, каталитическая активность очищенного фермента составляла не более 10% от активности внутренней мембраны митохондрий.

Суммируя, уместно процитировать одного из пионеров изучения разделения и реконструкции компонентов дыхательной цепи: «Не только различные солюбилизирующие агенты в различных условиях могут давать разные «растворимые» ферменты, но и одни и те же агенты в одних и тех же условиях в одной пробирке могут давать более чем один тип NADH-дегидрогеназ. ...мы не должны недооценивать гетерогенность частиц, используемых в качестве исходного материала» [30]. Существенного прогресса в получении «минимального» ротенон-чувствительного фермента, способного к векторному переносу протонов после встраивания в протеолипосомы, к сожалению, пока нет.

2.2.5. NADH-дегидрогеназа Типа 2 (FP, низкомолекулярный фермент). Этот препарат – минимальный каталитически активный водорастворимый фрагмент Комплекса I. FP получают в очищенном виде после обработки Комплекса I хаотропными агентами при 38° в анаэробных условиях [139]. Полученная таким образом NADH-дегидрогеназа после очистки состоит из трех полипептидов с молекулярными массами 51, 24 и 9 кДа. Фермент существенно обогащен (по сравнению с Комплексом I) FMN, негемовым железом и кислото-лабильной серой (13, 60 и 60 нмоль на 1 мг белка соответственно). FP катализирует быстрое ротенон-нечувствительное окисление NADH менадионом, феррицианидом и гексааминорутением (наиболее эффективным акцептором электронов [63–65, 139]), [4В-³H]NADH-H₂O [83] и NADH:ацетилпиридин-NAD⁺-трансгидрогеназную активность [64]. Считают, что трехсубъединичный железо-серный флавопротеин (FP) –

минимальный фрагмент Комплекса I способный окислять NADH. Фермент имеет центр связывания NADH (на субъединице с молекулярной массой 51 кДа [98]) и два (один биядерный, $E_m = -456$ мВ, и один тетраядерный, $E_m = -410$ мВ) железо-серных кластера [61]. FP можно расщепить на две фракции: FP-I (51 кДа) и FP-(II + III) (24 кДа + 9 кДа); обе – каталитически неактивные. Неизвестно, с какой субъединицей связан флаavin, так как при попытках разделить FP на отдельные компоненты FMN диссоциирует. Хотя специфичность этой простейшей NADH-дегидрогеназы к субстрату и акцепторам электронов сильно изменена из-за относительно жестких процедур при ее выделении [139], FP – достаточно удобный препарат для изучения начальных этапов окисления NADH.

3. ПАРАМЕТРЫ СТАЦИОНАРНОЙ КИНЕТИКИ

В табл. 2 представлены кажущиеся константы сродства мембраносвязанного Комплекса I (СМЧ) к нуклеотидам-субстратам, измеренные по зависимостям начальных скоростей реакции от концентрации субстратов в ротенон-чувствительных реакциях. На графиках двойных обратных координат ($1/\text{скорость} - 1/[\text{субстрат}]$) как в прямой реакции, так и в реакции $\Delta\bar{p}_H$ -зависимого обратного переноса электронов не наблюдается отклонений от простой гиперболической функции. Это свидетельствует о существовании либо единственного центра связывания субстрата, либо нескольких центров функционирующих независимо, либо, наконец, двух (или бо-

лее) центров, работающих «абсолютно» кооперативно (флип-флоп механизм [140]). Сильное различие между кажущимся сродством к NAD^+ как конкурентному ингибитору окисления NADH (1,2 мМ) и как субстрату в реакции обратного переноса (7 мкМ) позволяют предполагать, что в прямой и обратной реакциях могут участвовать разные нуклеотидсвязывающие центры. Эта гипотеза подтверждается «односторонним» ингибированием окисления NADH его аналогом – ADP-рибозой [28].

4. ПРЕСТАЦИОНАРНАЯ КИНЕТИКА (МЕДЛЕННОЕ ВЗАИМОПРЕВРАЩЕНИЕ АКТИВНОЙ И НЕАКТИВНОЙ ФОРМ ФЕРМЕНТА)

4.1. История проблемы. Как уже упоминалось, все активности и параметры, обсуждавшиеся в предыдущих разделах, относятся к «активированной» NADH:хинон-редуктазе. Как будет ясно из последующего обсуждения, практически все препараты мембраносвязанного фермента млекопитающих представлены гетерогенной смесью активной и деактивированной* форм. Аномальное поведение фермента впервые, по-видимому, было замечено Слейтером еще в 1950 г., обнаружившим лаг-фазу в NADH:цито-

* Для обозначения необычной, каталитически неактивной формы фермента мы пользуемся термином «деактивированный фермент». Этот термин эквивалентен английскому «resting enzyme» и обозначает, в отличие от «инактивированный», такое состояние неактивного фермента, которое после определенной обработки приводит к появлению его каталитической активности.

Таблица 2. Относительное сродство фермента к нуклеотидам в прямой и обратной реакциях [28, 39, 40] (СМЧ^а, рН 8,0, 25°)

	Реакция		
	NADH \longrightarrow Q ^б		OH ₂ \longrightarrow NAD ^в
	сопряженная	разобшенная	
K _m , мкМ	7 (NADH)	7 (NADH)	7 (NAD ^в)
K _i , мкМ		1,250 (NAD ^в)	40 (NADH)
K _i для ADP-рибозы, мкМ ^г , (конкурентное ингибирование)	24	25	не ингибирует

^а AS-субмитохондриальные частицы [29] с дыхательным контролем 7.

^б В присутствии антимицина А и 0,1 мМ Q₁.

^в АТР-зависимый, поддерживаемый окислением сукцината обратный перенос электронов.

^г NADH-оксидазная реакция.

хром *s*-редуктазной реакции, катализируемой препаратом Кейлина–Хартри (фрагменты внутренней мембраны митохондрий сердца быка [141]) в присутствии цианида (табл. 1, реакция 2). Двенадцать лет спустя Моррисон и Кинг наблюдали ярко выраженный лаг-период в NADH:цитохром *s*-редуктазной реакции, катализируемой аналогичным препаратом [142]. Дальнейшие исследования показали, что за наблюдаемую лаг-фазу ответственен участок дыхательной цепи между NADH-дегидрогеназой и Комплексом III (т.е. реакция восстановления убихинона) [143]. Терминализация реконструированной NADH-оксидазы, которую можно было полностью обратить добавлением NADH в аэробных условиях, позднее была показана Лузиковым и сотр., которые показали, что прогретые препараты более чувствительны к разрушающему действию химотрипсина, олеата и фосфолипазы [144, 145]. Эти авторы объяснили свои наблюдения тем, что компоненты дыхательной цепи существуют в активированной и неактивной формах в соотношении, которое зависит от скорости переноса электронов [145, 146]. При попытках объяснить противоречивые данные литературы, касающи-

ся чувствительности NADH-оксидазной активности к SH-реагентам [147, 148], Эстабрук и соавт. пришли к заключению о том, что после инкубации при 37° «...частицы *помнят*, что были подвергнуты действию высокой температуры и таким образом приобрели чувствительность по отношению к ингибирующему действию NEM» [149]. Хотя пионерские работы Эстабрука и соавт. прямо указывали на гетерогенность Комплекса I в составе внутренней мембраны митохондрий, существование самой проблемы игнорировалось до недавнего времени. В последние годы это необычное явление было более или менее детально изучено в нашей лаборатории. Результаты этих исследований кратко суммированы ниже.

4.2. Феноменология. Рисунок 2 изображает кривые регистрации ротенон-чувствительного окисления или восстановления NADH или NAD^+ в прямой и обратной реакциях, катализируемых двумя препаратами СМЧ: частицами, прогретыми в течение ≈ 60 мин при 30° (кривые 2), и такими же частицами после короткой преинкубации с NADH в аэробных условиях (кривые 1). Отметим несколько существенных для дальней-

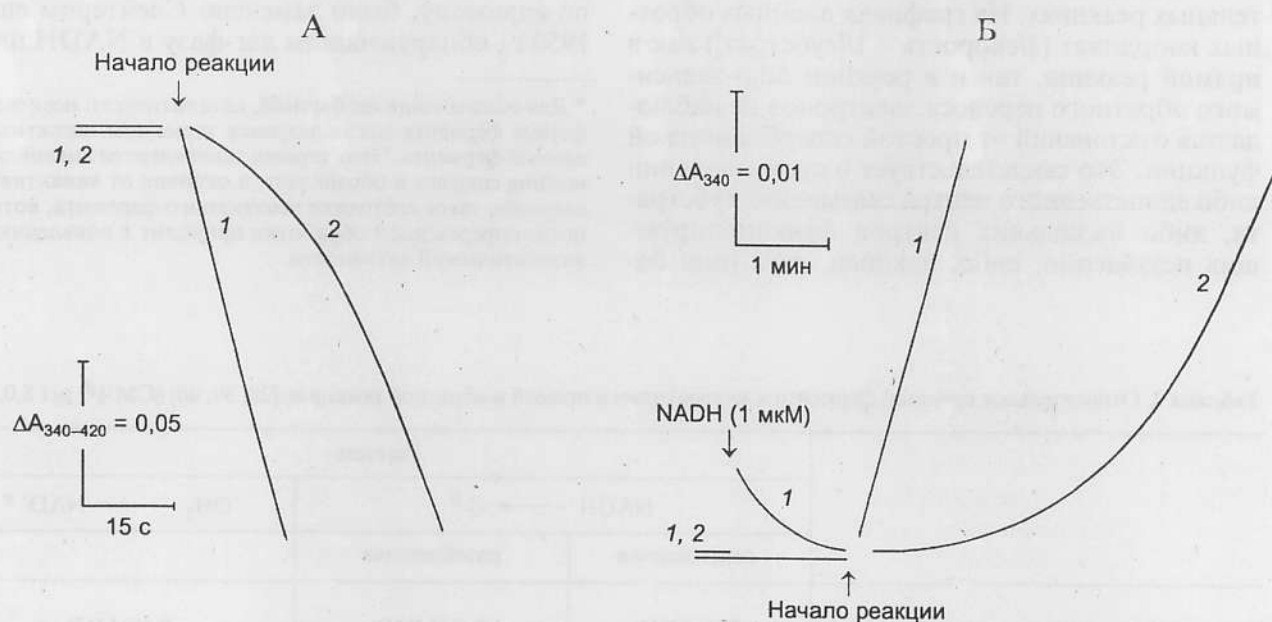


Рис. 2. Кинетика реакций, катализируемых активным (кривые 1) и деактивированным (кривые 2) препаратами СМЧ [150]. Деактивированные AS-СМЧ (10 мг на мл) получали преинкубацией при 30° в течение 1 ч в среде: 0,25 М сахароза, БСА (1 мг на мл), 0,1 мМ ЭДТА, 50 мМ Нерес-КОН (рН 8,0) и олигомицин (0,4 мкг на мг белка СМЧ). А. NADH-оксидазную активность СМЧ регистрировали спектрофотометрически (спектрофотометр Hitachi-557, снабженный приставкой для быстрого смешивания, время смешивания реагентов – 6 мс). Один шприц заполняли смесью: 0,25 М сахароза, 0,1 мМ ЭДТА, 50 мкМ СССР, СМЧ (0,2 мг на мл); другой шприц был заполнен той же средой с добавленным 0,2 мМ NADH, но без СМЧ. Б. Реакцию $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ -зависимого обратного переноса электронов на NAD^+ измеряли в среде: 0,25 М сахароза, 20 мМ Нерес-КОН (рН 8,0), 0,1 мМ ЭДТА, БСА (1 мг на мл), 20 мМ сукцинат, 5 мМ NAD^+ . Реакцию начинали (указано стрелкой) добавлением СМЧ (25 мкг на мл) (кривая 2, деактивированные СМЧ) или NAD^+ и сукцината (кривая 1). СМЧ предварительно активировали добавлением 1 мкМ NADH

шего обсуждения моментов. Все препараты, способные окислять NADH в ротенон-чувствительной реакции, которые были проанализированы в нашей лаборатории: СМЧ, препарат Кейлина-Хартри [45], очищенная NADH:цитохром *c*-редуктаза [43] и изолированный Комплекс I [151], качественно вели себя так, как изображено на рис. 2, А, в то время как при измерении феррицианид- или гексааминоуретений-редуктазных активностей этих же препаратов или любой активности дегидрогеназы Типа 2 лаг-фазы при окислении NADH не наблюдалось.

При использовании Q_1 в качестве акцептора электронов только ротенон-чувствительная составляющая реакции обнаруживала такое «аномальное» поведение. Хотя окисление или восстановление NADH или NAD^+ , катализируемое прочно сопряженными частицами в стационарной фазе реакции, весьма чувствительны к разобщителям, полувремени активации как для сопряженных, так и для полностью или частично разобщенных частиц одинаковы. Можно, таким образом, считать, что активация представляет собой $\Delta\bar{d}_n$ -независимый процесс. *Начальные скорости* реакций, катализируемых препаратами, специально подвергнутыми термообработке, близки к нулю, тогда как СМЧ или Комплекс I, полученные по стандартным методикам, характеризуются весьма переменными начальными скоростями реакции в зависимости от конкретного препарата. Полнота активации фермента при аэробной преинкубации с NADH существенным образом зависит от концентрации белка в образцах. Для полной активации разведенных препаратов (5–50 мкг белка на мл) достаточно добавления очень низких концентраций NADH (5–10 мкМ), тогда как для полной активации концентрированных суспензий требуется добавление высоких (миллимолярных) концентраций NADH. Выяснилось, что во время преинкубации концентрированных образцов (в присутствии NADH) часть образующегося активного фермента быстро окисляет добавленный NADH (и/или кислород или хинон), а оставшаяся часть фермента остается неактивной. Необходимо отметить, что само по себе восстановление не приводит к превращению неактивного фермента в активный. В присутствии NADH активация не наблюдается, если эндогенный убихинон восстановлен сукцинатом (анаэробно или в присутствии цианида). Таким образом, для достижения полной каталитической активности фермента необходим относительно медленный (по сравнению со стационарным режимом работы) «начальный» редокс-цикл. В обычных условиях измерения NADH-оксидазной или NADH:убихинон-редуктазной активностей (рН $\approx 7,5$, 20–27°)

полувремени активации не велико (5–20 с), вследствие этого само явление легко проглядеть, особенно при использовании медленно отвечающих систем регистрации, таких, например, как покрытый мембраной кислородный электрод (NADH-оксидаза) или современный спектрофотометр с компьютеризированной системой записи кинетических кривых.

4.3. Деактивация. Единственный на сегодняшний день известный фактор, сильно влияющий на переход активного фермента в его неактивную форму, – температура. Ни NAD^+ , ни восстановление эндогенного убихинона, ни NADH в условиях, когда убихинон восстановлен, ни присутствие двухвалентных катионов, ни добавление конкурентного ингибитора ADP-рибозы [28], ни разведение или концентрирование препаратов фермента, ни анаэробизм, ни присутствие феррицианида или реагентов на сульфгидрильные группы по отдельности или в их комбинациях (если это возможно) существенно не влияют на скорость деактивации. Влияние же температуры чрезвычайно сильно. Энергия активации для процесса деактивации, определенная по линейным графикам Аррениуса в области 25–40° [29, 151], равна 270 кДж/моль! При 30° падение начальной скорости (рис. 2) в реакциях прямого и обратного переноса электронов можно описать почти как реакцию первого порядка с $t_{1/2}$, равным 15 мин. Индуцированная нагреванием фермента деактивация была исходно описана как необратимый процесс [29]. Более детальный анализ показал, что термодезактивированные СМЧ сохраняют постоянную остаточную активность [124]. Следовательно, процесс деактивации можно рассматривать как самопроизвольное установление равновесия между двумя формами фермента (реакция 1, рис. 3). Положение равновесия почти не зависит от температуры. Единственным соединением, влияющим на самопроизвольно устанавливаемое равновесие оказался специфический ингибитор Комплекса I – ротенон [124], который частично защищает и частично обращает вызванную нагреванием деактивацию. Активная форма фермента связывает ротенон со сродством на два порядка более высоким, чем неактивная. Чрезвычайно прочное связывание ротенона с активным ферментом позволяет думать, что ингибитор действует как аналог переходного состояния [124].

4.4. Активация. Как показано на схеме, изображенной на рис. 3, есть два пути перехода дезактивированного фермента в активную форму. Один путь, не зависящий от присутствия субстратов реакции, – медленное равновесие внутри цикла реакций 1–5–6–7, приводящее к существ-

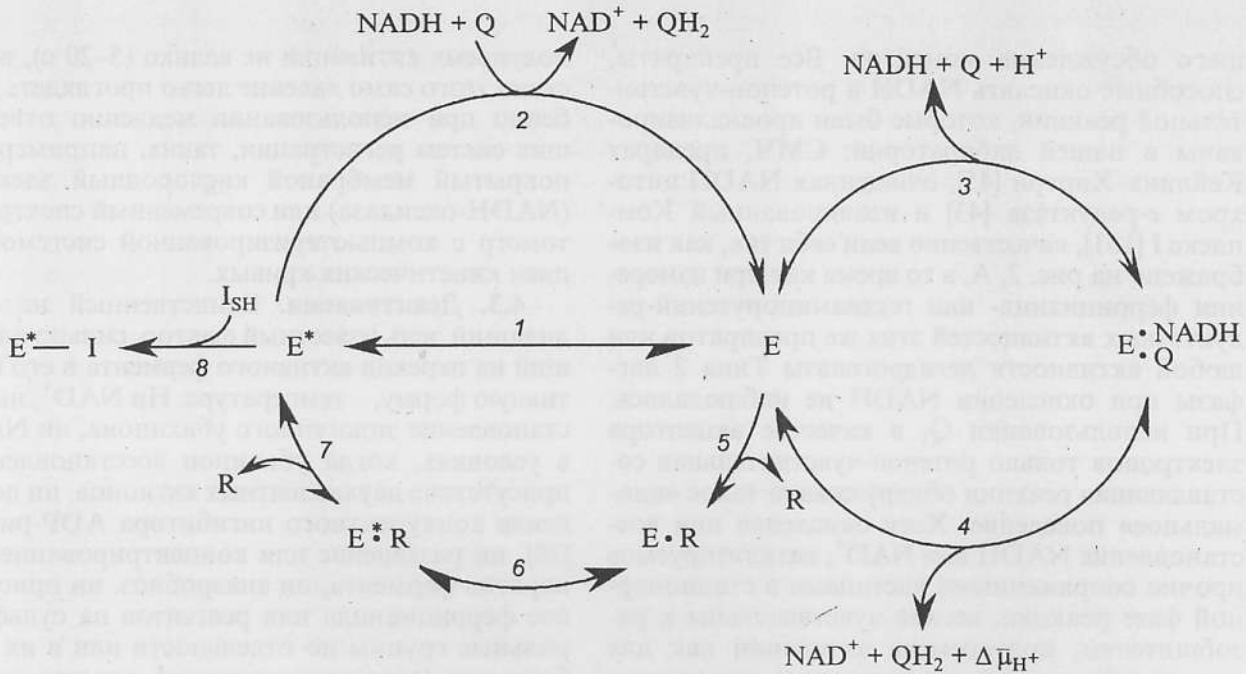


Рис. 3. Схема реакций активного и деактивированного Комплекса I с субстратами и ингибиторами. E и E* – активная и деактивированная формы фермента соответственно; R – ротенон; I_{SH} – ингибиторы, реагирующие с сульфгидрильными группами. «Полные» (→) и «неполные» (⇌) стрелки обозначают равновесия отдельных стадий, пронумерованных цифрами. Полное объяснение – см. текст

венной активации фермента только в присутствии ротенона [124]. Другой путь (реакция 2) – медленный переход, зависящий от каталитического оборота (или полуоборота) фермента. Окисление NADH активным ферментом (рис. 2, кривые 1 и стационарная фаза кривых 2) не чувствительно к NEM и другим сульфгидрильным реагентам или к двухвалентным катионам. В противоположность этому реакции, инициируемые деактивированными препаратами, полностью блокируются, если фермент предварительно обработан SH-реагентами. Лаг-фаза становится более продолжительной в присутствии двухвалентных катионов или при щелочных значениях pH [150]. Именно процесс активации фермента чувствителен к действию этих эффекторов (реакции 1 и 2, рис. 3). Деактивированный фермент сохраняет способность катализировать все реакции окисления NADH искусственными акцепторами электронов. Железо-серные кластеры деактивированного фермента восстанавливаются NADH так же, как и в активном препарате [72]. Для перехода фермента в активную форму в реакции 2 абсолютно необходимо поступление восстановительных эквивалентов от субстратов-нуклеотидов (NADH или NADPH). С другой стороны, продолжительная преинку-

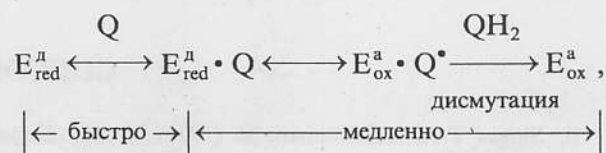
бация фермента с NADH в условиях, когда убихинон полностью восстановлен (анаэробно или в присутствии сукцината и антимицина A или цианида), не приводит к активации [29]. Фермент не активируется также после преинкубации с NAD⁺ или ADP-рибозой; следовательно, связывание нуклеотида и окисленного хинона само по себе не вызывает перехода в активное состояние. Инкубация деактивированных СМЧ в присутствии субстехиометрических концентраций NADH и NADH-регенерирующей системы приводит к полной активации фермента [29]. Все эти наблюдения позволяют считать, что для перехода термодинамически стабильного неактивного фермента в термодинамически нестабильную, но каталитически активную форму необходимо, по крайней мере, один медленный оборот (точнее, полуоборот) фермента. При катализе активным ферментом окисления NADH убихиноном, разница окислительно-восстановительных потенциалов для пар: субстраты/продукты (-320 мВ [101] и +60 мВ [152], соответственно) обеспечивает свободной энергией трансмембранный перенос протонов и возникновение $\Delta \bar{\mu}_{H^+}$. Та же реакция, катализируемая деактивированной формой фермента, приводит к запасанию свободной энергии в виде напряжен-

ной (термодинамически нестабильной) конформации фермента. Другими словами, существование равновесий 1 и 2 (рис. 3) приводит к тому, что часть свободной энергии окисления NADH используется для поддержания каталитически активного состояния фермента. Такой вывод ведет к дополнительным следствиям.

Во-первых, как спонтанная деактивация, так и редокс-зависимая активация – медленные процессы по сравнению с числом оборотов активного фермента в реакциях 3 и 4. Следовательно, маловероятно, что комбинация реакций 2 и 1 вносит существенный вклад в стационарную скорость окисления NADH. С другой стороны, очевидно, что такой футильный цикл может играть существенную роль в тонкой настройке «входных ворот» дыхательной цепи, запасующей энергию. Было показано, что при окислении NADH препаратом СМЧ при разных уровнях восстановления убихинона (или препаратом Комплекса I в присутствии экзогенного Q₁ и разных количествах добавленной бактериальной хинооксидазы) достигается различный уровень активации фермента [153]. В отличие от спонтанной деактивации и реакции, катализируемой активным ферментом, редокс-зависимая активация чувствительна к ряду факторов, потенциально имеющих физиологическое значение, таким, например, как изменение pH и присутствие двухвалентных катионов [150]. Следует также иметь в виду появление в деактивированном ферменте высоко реактивной сульфгидрильной группы. Возможно, что регулирование суммарной ферментативной активности окисления NADH осуществляется природными соединениями, например внутримитохондриальным глутатионом [154].

Другой аспект проблемы имеет отношение к обратимости реакций, катализируемых Комплексом I (см. раздел 2.1.7). Так как поддержание фермента в активной форме требует энергии, освобождающейся в NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции, трудно себе представить, что фермент функционирует как простой катализатор, уравнивающий NADH/NAD⁺, Q/QH₂ и Δψ_н⁺ (если только реакция 2 не является обратимой). Обнаружение различной чувствительности к ротенону прямой и обратной реакции [124], а также одностороннего ингибирования окисления NADH конкурентным ингибитором [28] позволяют считать, что при протекании реакции в обоих направлениях участвуют различные центры связывания субстратов и продуктов. Строго говоря, это означает, что механизмы прямой и обратной реакций различаются. Аналогичное предположение было высказано нами для другого «обратимого» преобразователя энергии – F₁-F₀ АТФ-синтетазы [155].

О молекулярном механизме активации/деактивации фермента ничего не известно. Изменение каталитической активности, сильная температурная зависимость процесса, изменение в чувствительности к сульфгидрильным реагентам и сродства к ротенону свидетельствуют о сильных конформационных изменениях структуры фермента. Так как в настоящее время общепризнано, что убисемихинон(ы) служит интермедиатом стационарных NADH→Q и QH₂→NAD⁺ активностей [41, 72, 156, 157], реакцию 2 (рис. 3) формально можно представить следующим образом:



где индексы red, ox, д и а соответствуют восстановленному, окисленному, деактивированному и активному ферменту соответственно. Деактивированный фермент, восстановленный NADH, окисляется хиноном в одноэлектронной реакции (по-видимому, в этом процессе участвует железо-серный центр N-2 [11, 41, 157]). Эта медленная реакция сопровождается перестройкой белка и формированием специфического места связывания убисемихинона. В отсутствие последующего переноса электронов через фермент убисемихиноны дисмутируют, а белок теряет приобретенную активную конформацию.

Интересно отметить, что феноменологически сходная редокс-зависимая активация была обнаружена для гетеродимерной Fe-S, Ni-содержащей H₂:хинон-оксидоредуктазы из *Alcaligenes eutropus* [158], *Azotobacter vinelandi* [159] и *Brodhyrhizobium japonicum* [160].

5. Заключение и перспективы дальнейших исследований. Несмотря на резко возросший в последние годы интерес к изучению молекулярной структуры и механизма работы Комплекса I млекопитающих, микроорганизмов, грибов и растений, трудно не согласиться с тем, что за последние 20 лет успехи в решении проблем оказались весьма скромными; до сих пор не известны ни последовательность реакций внутримолекулярного переноса электронов, ни стехиометрия сопряжения, ни минимальный субъединичный состав, достаточный для функционирования этого преобразователя энергии. По нашему мнению, существенный прогресс будет достигнут только после выделения очищенного фермента, способного к редокс-зависящему векторному переносу протонов в протеолипосомах. Отсутствие специфических ингибиторов и ис-

кусственных акцепторов/доноров электронов, взаимодействующих с центрами, отличными от нуклеотид- и хинонсвязывающих участков, сильно затрудняет построение новых моделей и описание путей переноса электронов. В настоящее время 14–20 субъединичная NADH-дегидрогеназа NDH-1 из *Paracoccus denitrificans* [5], наиболее простой аналог 42-субъединичного Комплекса I млекопитающих, стала доступной для молекулярно-генетических манипуляций. Сравнительное изучение свойств ферментов млекопитающих и более простых бактериальных ферментов несомненно поможет пониманию функций индивидуальных субъединиц. Яс-

но, что дальнейшие исследования каталитических свойств уже доступных и новых препаратов фермента будет содействовать прогрессу в этой увлекательной области биоэнергетики.

Выполнение цитированных работ нашей группы финансировалось Российским фондом фундаментальных исследований (грант 96-04-48185), Национальным институтом здоровья США (NIH Fogarty International Research Collaborative Grant R03 TW00140-01A2) и программой «Научные школы» (грант 96-15-97822). Авторы признательны академику В.П. Скулачеву за полезные критические замечания.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Singer, T.P., and Gutman, M. (1971) *M. Adv. Enzymol.*, **34**, 79–153.
- Ragan, C.I. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **456**, 249–290.
- Fearnley, I.M., and Walker, J.F. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 105–134.
- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., and Preis, D. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **197**, 563–576.
- Yagi, T. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 1–17.
- Rao, N.A., Felton, S.P., Huennekens, F.M., and Mackler, B. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 449–455.
- Ohnishi, T. (1979) in: *Membrane Proteins in Energy Transduction* (Capaldi, R. A., ed.), Dekker, New York, pp. 1–87.
- Ohnishi, T., and Salerno, J.C. (1982) in: *Iron-sulfur proteins* (Spiro, T., ed.), vol. IV, Wiley Publishing Co. Inc., New York, pp. 285–327.
- Beinert, H., and Albracht, S.P.J. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **683**, 245–277.
- Sled, V.D., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., Meinhardt, S.W., Fukumori, Y., Calhoun, M., Gennis, R.B., and Ohnishi, T.J. (1993) *Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 347–356.
- Vinogradov, A.D., Sled, V.D., Burbaev, D.Sh., Grivennikova, V.G., Moroz, I.A., and Ohnishi T., (1995) *FEBS Lett.*, **370**, 83–87.
- Berry, E.A., and Trumpower, B.L. (1985) in: *Coenzyme Q* (Lenaz, G., ed.), John Wiley & Sons Ltd., New York, pp. 365–389.
- Yu, C.-A., and Yu, L.J. (1993) *Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 259–274.
- Gennis, R., and Ferguson-Miller, S. (1995) *Science*, **269**, 1063–1065.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinza-Itoh, K., Nakashima, R., Yano, R., and Yoshikawa, S. (1995) *Science*, **269**, 1069–1074.
- Brandt, U. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 79–91.
- Walker, J.E. (1992) *Quart. Rev. Biophys.*, **25**, 253–324.
- Biochim. Biophys. Acta* (Brandt, U., ed.) (1998), **1364**.
- Vinogradov, A.D. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 169–185.
- Hatefi, Y. (1978) *Methods Enzymol.*, **53**, 3–4.
- Singer, T.P., and Ramsay, R.R. (1992) in: *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L. ed.), Elsevier Science Publishers B.V., Amsterdam, pp. 145–162.
- Friedrich, T., Van Heek, P., Leif, H., Ohnishi, T., Forche, E., Kunze, B., Jansen, R., Trowitzsch-Keinast, W., Höfle, G., Reichenbach, H., and Weiss, H. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **219**, 691–698.
- Degli Esposti, M., Ghelli, A., Ratta, M., Cortes, D., and Estornell, E. (1994) *Biochem. J.*, **301**, 161–167.
- Oettmeier, W., Masson, K., and Soll, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1099**, 262–266.
- Satoh, T., Miyoshi, H., Sakamoto, K., and Iwamura, H. (1996) *Biochim. Biophys. Acta*, **1273**, 21–30.
- Kean, E.A. (1970) *Biochem. Pharmacol.*, **19**, 2201–2210.
- Kean, E.A., Gutman, M., and Singer, T.P. (1971) *J. Biol. Chem.*, **246**, 2346–2353.
- Zharova, T.V., and Vinogradov, A.D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 256–264.
- Kotlyar, A.B., and Vinogradov, A.D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**, 151–158.
- King, T.E., Howard, R.L., Kettman, J., Hegdekar, B.M., Kuboyama, M., Mickel, K.S., and Possehl, E.A. (1966) in: *Flavins and Flavoproteins* (Slater, E.C., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 441–481.
- Cremona, T., and Kearney, E.B. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2328–2334.
- King, T.E., and Howard, R.L. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1686–1698.
- Baugh, R.F., and King, T.E. (1972) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **49**, 1165–1173.
- Paech, C., Reynolds, J.G., Singer, T.P., and Holm, R.H. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 1922–1927.
- Finel, M., Skehel, J.M., Albracht, S.P.J., Fearnley, I.M., and Walker, J.E. (1992) *Biochemistry*, **31**, 11425–11434.
- Mackler, B. (1961) *Biochim. Biophys. Acta*, **50**, 141–146.
- Pharo, R.L., Sordahl, L.A., Vyas, S.R., and Sanadi, D.R. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 4771–4780.
- Hatefi, Y., and Stempel, K.E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2350–2357.
- Vinogradov, A.D. (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 367–375.
- Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 262–268.
- Burbaev, D.Sh., Moroz, I.A., Kotlyar, A.B., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1989) *FEBS Lett.*, **254**, 47–51.
- Lee, C.P., and Ernster, L. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 543–548.
- Hatefi, Y., and Rieske, J. S. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 225–231.
- King, T.E. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 202–208.
- Vinogradov, A.D., and King, T.E. (1979) *Methods Enzymol.*, **55**, 118–127.
- Wan, Y.-P., Williams, R.H., Folker, K., Leung, K.H., and Racker, E. (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 11–15.

47. Schatz, G., and Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 1429-1437.
48. Lawford, H.G., and Garland, P.B. (1971) *Biochem. J.*, **130**, 1029-1044.
49. Ragan, C.I., and Hinkle, P.C. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 8472-8480.
50. Helfenbaum, L., Ngo, A., Ghelli, A., Linnane, A.W., and Degli Esposti, M. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**, 71-80.
51. Fowler, L.R., and Richardson, S.H. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 456-463.
52. Ragan, C.I., and Heron, C. (1978) *Biochem. J.*, **174**, 783-790.
53. Mitchell, P. (1975) *FEBS Lett.*, **56**, 1-6.
54. Degli Esposti, M., Chelli, A., Crimi, M., Estronell, E., Fato, R., and Lenaz, G. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **190**, 1090-1096.
55. Degli Esposti, M., Crimi, M., and Ghelli, A. (1994) *Biochem. Soc. Trans.*, **22**, 209-212.
56. Tan, A.K., Ramsay, R.R., Singer, T.P., and Miyoshi, H. (1993) *J. Biol. Chem.*, **268**, 19328-19333.
57. Morgan-Hughes, J.A., Shapira, A.H.V., Cooper, J.M., Holt, I.J., Harding, A.E., and Clark, J.B. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1018**, 217-222.
58. Estronell, E., Fato, R., Pallotti, F., and Lenaz, G. (1993) *FEBS Lett.*, **332**, 127-131.
59. Genova, M.L., Castelluccio, C., Fato, R., Parenti Castelli, G., Merlo Pich M., Formiggini, G., Bovina, C., Marchetti, M., and Lenaz, G. (1995) *Biochem. J.*, **311**, 105-109.
60. Singer, T.P. (1974) *Meth. Biochem. Anal.*, **22**, 123-175.
61. Ohnishi, T., Ragan, C.I., and Hatefi, Y. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 2782-2788.
62. Dooijewaard, G., and Slater, E.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 1-15.
63. Dooijewaard, G., and Slater, E.C. (1976) *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 16-35.
64. Hatefi, Y., and Galante, Y.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 846-850.
65. Gavrikova, E.V., Grivennikova, V.G., Sled, V.D., Ohnishi, T. and Vinogradov, A.D. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1230**, 23-30.
66. Hinkle, P.C., Butow, R.A., Racker, E., and Chance, B. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5169-5173.
67. Boveris, A., and Cadenas, E. (1975) *FEBS Lett.*, **54**, 311-314.
68. Chance, B., Sies, H., and Boveris, A. (1979) *Physiol. Rev.*, **59**, 527-605.
69. Turrens, J.F., Boveris, A. (1980) *Biochem. J.*, **191**, 421-427.
70. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Engel, P.C., Matthews, R.G., Schuman, M., and Sullivan, P.A. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 891-897.
71. Fridovich, I. (1974) *Adv. Enzymol.*, **41**, 35-97.
72. Kotlyar, A.B., Sled, V.D., Burbaev, D.Sh., Moroz, I.A., and Vinogradov, A.D. (1990) *FEBS Lett.*, **264**, 17-20.
73. Takeshige, K., and Minakami, S. (1979) *Biochem. J.*, **180**, 129-135.
74. Kang, D., Narabayashi, H., Sata, T., and Takeshige, K. (1983) *J. Biochem. (Tokyo)*, **94**, 1301-1306.
75. Krishnamoorthy, G., and Hinkle, P. (1988) *J. Biol. Chem.*, **263**, 17566-17575.
76. Chan, P.C., and Bielski, B.H.J. (1974) *J. Biol. Chem.*, **249**, 1317-1319.
77. Chan, P.C., and Bielski, B.H.J. (1980) *J. Biol. Chem.*, **255**, 874-876.
78. Halliwell, B. (1987) *FASEB J.*, **1**, 358-364.
79. Luft, R. (1994) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**, 8731-8738.
80. Слель В.Д., Зинич В.Н., Котляр А.Б. (1989) *Биохимия*, **54**, 1571-1575.
81. Lee, C.P., Sigmard-Duquesne, N., Hoberman, H., and Ernster, L. (1965) *Biochim. Biophys. Acta*, **105**, 397-408.
82. Ernster, L., Hoberman, H., Howard, R.L., King, T.E., Lee, C.P., Mackler, B., and Sottocasa, G. (1965) *Nature*, **207**, 940-941.
83. Chen, S., and Guillory, R.J. (1985) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **129**, 584-590.
84. Ernster, L., Estabrook, R.W., Hochstein, P., and Orrenius, S. (1987) *Chem. Scr.*, **27**, 1-207.
85. Li, R., Bianchet, M.A., Talalay, P., and Amzel, L.M. (1995) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 8846-8850.
86. Sled, V.D., Rudnitsky, N.I., Hatefi, Y., and Ohnishi, T. (1994) *Biochemistry*, **33**, 10069-10075.
87. Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1143**, 199-203.
88. Djavadi-Ohanian, L., and Hatefi, Y. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 9397-9403.
89. Rydström, J., Montelius, J., Bäckström, D., and Ernster, L. (1978) *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 370-380.
90. Ragan, C.I., Widger, W.R., and King, T.E. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 894-900.
91. Löw, H., and Vallin, I. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **69**, 361-374.
92. Bakker, P.T.A., and Albracht, S.P.J. (1986) *Biochim. Biophys. Acta*, **850**, 413-422.
93. van Belzen, R., and Albracht, S.P.J. (1989) *Biochim. Biophys. Acta*, **974**, 311-320.
94. van Belzen, R., van Gaalen, M.C.M., Cuypers, P.A., and Albracht, S.P.J. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1017**, 152-159.
95. Albracht, S.P.J., and de Jong, A.M.P. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 92-106.
96. Glinn, M.A., Lee, C.P., and Ernster, L. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 246-254.
97. Chen, S., and Guillory, R.J. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 8318-8323.
98. Deng, P.S.K., Hatefi, Y., and Chen, S. (1990) *Biochemistry*, **29**, 1094-1098.
99. Yagi, T., and Dinh, T.M. (1990) *Biochemistry*, **29**, 5515-5520.
100. Xu, X.-M., and Yagi, T. (1991) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **174**, 667-672.
101. Preis, D., Van der Pas, J.C., Nehls, U., Röhlen, D.-A., Sackmann, U., Jahnke, U., and Weiss, H. (1991) *Biochim. Biophys. Acta*, **1089**, 389-390.
102. Röhlen, D.A., Hoffmann, J., Van der Pas, J.C., Nehls, U., Preis, D., Sackmann, U., and Weiss, H. (1991) *FEBS Lett.*, **278**, 75-78.
103. Clark, W.M. (1960) *Oxidation Reduction Potentials of Organic Systems*, Williams and Wilkins, Baltimore.
104. Sanadi, D.R., and Fluharty, A.L. (1963) *Biochemistry*, **2**, 523-528.
105. Grivennikova, V.G., Gavrikova, E.V., Timoshin, A.A., and Vinogradov, A.D. (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 282-292.
106. Sucheta, A., Ackrell, B.A.C., Cochran, B., and Armstrong, F.A. (1992) *Nature*, **356**, 361-362.
107. Grivennikova, V.G., and Vinogradov, A.D. (1982) *Biochim. Biophys. Acta*, **682**, 491-495.
108. Tushurashvili, P.R., Gavrikova, E.V., Ledenev, A.N., and Vinogradov, A.D. (1985) *Biochim. Biophys. Acta*, **809**, 145-159.
109. Chance, B., and Hollunger, G. (1960) *Nature*, **185**, 666-672.
110. Klingenberg, M., and Slenczka, W. (1959) *Biochem. Z.*, **331**, 486-517.
111. *Proceedings of the Fifth International Congress of Biochemistry* (1963) vol. 5, Pergamon Press, Oxford, London, New York, Paris.
112. *Energy-linked Functions of Mitochondria* (Chance, B., ed.) (1963), New York, Academic Press.

113. Beyer, R. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 186–196.
114. Thorn, M. B. (1962) *Biochem. J.*, **85**, 116–127.
115. Kotlyar, A. B., and Vinogradov, A. D. (1984) *Biochim. Biophys. Acta*, **784**, 24–34.
116. Ackrell, B. A. C., Kearney, E. B., Edmondson, D. E. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 7114–7119.
117. Vasilyeva, E. A., Minkov, I. B., Fitin, A. F., and Vinogradov, A. D. (1982) *Biochem. J.*, **202**, 9–14.
118. Vasilyeva, E. A., Fitin, A. F., Minkov, I. B., and Vinogradov, A. D. (1980) *Biochem. J.*, **188**, 807–815.
119. Ernster, L., Carlsson, C., Hundal, T., and Nordenbrand, K. (1979) *Methods Enzymol.*, **55**, 399–407.
120. Panchenko, M. V., and Vinogradov, A. D. (1985) *FEBS Lett.*, **184**, 226–230.
121. Hommes, F. A. (1963) *Biochim. Biophys. Acta*, **77**, 173–182.
122. Racker, E., and Horstman, L. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 2547–2556.
123. Kotlyar, A. B., and Gutman, M. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 169–174.
124. Grivennikova, V. G., Maklashina, E. O., Gavrikova, E. V., and Vinogradov, A. D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 223–232.
125. Boyer, R. E. (1967) *Meth. Enzymol.*, **10**, 186–194.
126. Lee, C. P. (1979) *Meth. Enzymol.*, **55**, 105–112.
127. Huang, C. H., Keyhani, E., and Lee, C. P. (1973) *Biochim. Biophys. Acta*, **305**, 455–463.
128. Huang, C. H., and Lee, C. P. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **376**, 398–414.
129. Teixeira da Cruz, A., Rydström, J., and Ernster, L. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 203–211.
130. Rydström, J., Teixeira da Cruz, A., and Ernster, L. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **23**, 212–219.
131. Lenaz, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 207–221.
132. Hatefi, Y., Haavik, A. G., and Griffiths, D. E. (1962) *J. Biol. Chem.*, **237**, 1676–1680.
133. Hatefi, Y., and Rieske, J. S. (1967) *Meth. Enzymol.*, **10**, 239–245.
134. Ragan, C. I., and Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2563–2569.
135. Guénebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H., and Leonard, K. R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **265**, 409–418.
136. Galante, Y., and Hatefi, Y. (1978) *Meth. Enzymol.*, **53**, 15–21.
137. Finel, M., Majander, A.S., Tyynelä, J., De Jong, A.M.P., Albracht, S.P.J., and Wikström, M. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **226**, 237–242.
138. Buchanan, S.K., and Walker, J.E. (1996) *Biochem. J.*, **318**, 343–349.
139. Galante, Y., and Hatefi, Y. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 559–568.
140. Lazdunski, M., Petitclere, D., Chappellet, D., and Lazdunski, C. (1971) *Eur. J. Biochem.*, **20**, 124–135.
141. Slater, E. C. (1950) *Biochem. J.*, **46**, 499–503.
142. Morrison, R. O., and King, T. E. (1962) *Biochemistry*, **1**, 1017–1024.
143. Minakami, S., Schindler, F. J., and Estabrook, R. W. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2049–2054.
144. Luzikov, V. N., Saks, V. A., and Berezin, I. V. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 16–30.
145. Luzikov, V. N., and Romashina, L. V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 37–47.
146. Saks, V.A., Kupriyanov, V.V., and Luzikov, V.N. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **283**, 42–53.
147. Redfearn, E. R., Whittaker, P. A., Burgos, J. (1965) in: *Oxidases and Related Redox Systems* (King, T.E., Mason, H.S., Morrison, M., eds.), John Wiley & Sons, Inc., New York, pp. 943–959.
148. Minakami, S., Schindler, F. J., and Estabrook, R. W. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2042–2048.
149. Estabrook, R.W., Tyler, D.D., Gonze, J., Peterson, J.A. (1968) in: *Flavins and Flavoproteins* (Yagi, K., ed.), University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 268–279.
150. Kotlyar, A.B., Sled, V.D., and Vinogradov, A.D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 144–150.
151. Маклашина Е.О., Следь В.Д., Виноградов А.Д. (1994) *Биохимия*, **59**, 946–957.
152. Erecinska, M., and Wilson, D.F. (1967) *Arch. Biochem. Biophys.*, **174**, 143–157.
153. Маклашина Е.О., Виноградов А.Д. (1994) *Биохимия*, **59**, 1638–1645.
154. *Glutathione: Chemical, Biochemical and Medical Aspects* (Dolphin, D., Poulson, R., Avramovic, O., eds), (1989) John Wiley & Sons, New York.
155. Syroeshkin, A.V., Vasilyeva, E. A., and Vinogradov, A.D. (1995) *FEBS Lett.*, **366**, 29–32.
156. De Jong, A. M. P., and Albracht, S. P. J. (1994) *Eur. J. Biochem.*, **222**, 975–982.
157. van Belzen, R., Kotlyar, A.B., Moon, N., Dunham, R., Albracht, S.P.J. (1997) *Biochemistry*, **36**, 886–893.
158. Schneider, K., Patil, D.S., and Cammack, R. (1983) *Biochim. Biophys. Acta*, **748**, 353–361.
159. Sun, J.-H., and Arp, D. J. (1991) *Arch. Biochem. Biophys.*, **287**, 225–233.
160. Ferber, D.M., Moy, B., and Maier, R. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1229**, 334–346.

CATALYTIC PROPERTIES OF THE MITOCHONDRIAL NADH-UBIQUINONE REDUCTASE (COMPLEX I)

A.D. Vinogradov, E.V. Gavrikova, V.G. Grivennikova, T.V. Zharova, N.V. Zakharova

*Department of Biochemistry, School of Biology, Lomonosov Moscow State University,
Moscow 119899, Russia; fax: (7-095)939-3955; E-mail: adv@biochem.bio.msu.su*

Submitted July 15, 1998

The qualitative and quantitative characteristics of the reactions catalyzed by the most complex and least understood proton translocating unit of the mammalian respiratory chain (NADH-ubiquinone oxidoreductase, complex I) are described for the enzyme preparations with various extents of complicated organization, i.e., from intact mitochondria to the homogeneous small fragments of the enzyme. Special attention is given to the problems and pitfalls of reliable interpretation of the kinetic investigation of the enzyme activities. The detailed analysis of the problems concerning the slow active-inactive reversible enzyme transition is provided.

KEY WORDS: NADH-ubiquinone reductase, complex I, respiratory chain, enzyme hysteresis, bovine heart mitochondria.