

# МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ КОМПЛЕКС I

© 2003 г.

В. Г. ГРИВЕННИКОВА,

А. Д. ВИНОГРАДОВ

*Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова,  
Москва*

I. Введение. II. Структура Комплекса I. III. Каталитические активности Комплекса I и обратимость NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции. IV. Медленные изменения активности Комплекса I. V. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

Митохондриальная протон-транслоцирующая NADH:убихинон-оксидоредуктаза (ЕС 1.6.99.3, Комплекс I, первый пункт энергетического сопряжения) и ее функциональный гомолог – NADH-дегидрогеназа Типа-1 (NDH-1) плазматической мембраны бактерий катализируют окисление NADH убихиноном. Реакция сопровождается трансмембранным переносом четырех протонов при окислении одной молекулы NADH (2 электрона) и генерацией на сопрягающей мембране митохондрий разности электрохимических потенциалов ионов водорода ( $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ ):

*Принятые сокращения:* NDH-1 – NADH:хинон-оксидоредуктаза Типа-1; NDH-2 – NADH:хинон-оксидоредуктаза Типа-2;  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  – разность электрохимических потенциалов ионов водорода; FMN – флавиномононуклеотид; СМЧ – субмитохондриальные частицы; FP – флавопротеин; DSNa – додецилсульфат натрия; ПААГ – полиакриламидный гель; IP – железо-серный протеин; HP – гидрофобный протеин; *k*ДНК – кодирующая ДНК; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; Q<sub>n</sub> – гомолог природного убихинона, содержащий *n* изопреноидных остатков в положении 5 1,4 бензохинонового кольца; АФК – активные формы кислорода; NEM – N-этилмалеимид.

*Адрес для корреспонденции:* e-mail: vgrivennikova@biochem.bio.msu.ru (В.Г.Гривенникова).

Работа поддержана грантом 02-04-48679 РФФИ и грантом 00-15-97798 Программы «Ведущие научные школы».

Мы благодарны всем соавторам наших цитированных здесь публикаций за творческое содружество.



где Q и QH<sub>2</sub> – окисленная и восстановленная формы убихинона, а  $\bar{\text{H}}_{\text{in}}^+$  и  $\bar{\text{H}}_{\text{out}}^+$  – протоны, перенесенные из матрикса в межмембранное пространство митохондрий. Запасенная в виде  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  энергия используется для обеспечения синтеза АТФ, накопления ионов и других сдвигов равновесия химических реакций.

Образующийся в реакции (1) убихинол последовательно окисляется Комплексом III и цитохромоксидазой (Комплекс IV) так, что электроны переносятся на молекулярный кислород с образованием воды. Катализируя реакцию (1), Комплекс I, таким образом, осуществляет постоянную регенерацию окисленной формы NAD<sup>+</sup>, которая необходима для протекания окислительного распада органических веществ (углеводы, жиры, аминокислоты и др.).

Комплекс I – чрезвычайно сложный компонент дыхательной цепи: в митохондриях млекопитающих фермент построен, по крайней мере, из 46 различных субъединиц [21], в митохондриях гриба *Neurospora crassa* – не менее чем из 35 [141], а простейший гомолог фермента – NDH-1 плазматической мембраны бактерий содержит всего 13–14 субъединиц, которые считаются минимальным набором полипептидов, способных катализировать реакцию (1) [34, 149]. В составе фермента обнаружено несколько редокс-компонентов, предположительно участвующих в переносе электронов от NADH на убихинон: FMN [109], несколько железо-серных кластеров [15, 97, 100, 124] и прочно связанный убихинон [135].

Механизмы внутримолекулярного переноса электронов в Комплексе I и сопряженной с этим процессом векторной транслокации протонов, остаются не известными. Очень мало известно и о механизмах, регулирующих каталитическую активность фермента. Между тем, в последние годы интерес к изучению Комплекса I резко возрос после обнаружения прямой корреляции между нарушениями структуры фермента и возникновением различных патологических состояний клетки, в частности, развитием некоторых нейродегенеративных заболеваний [82, 118].

В настоящем обзоре мы кратко суммируем современные представления о структуре фермента и реакции, катализируемые Комплексом I. Особое внимание будет уделено необычным кинетическим свойствам фермента и возможным механизмам регулирования его активности. Сведения о структуре и свойствах редокс-компонентов фермента и предполагаемых механизмах трансформации энергии Комплексом I читатель может найти в обзоре, недавно опубликованном в журнале «Биохимия» [2].

## II. СТРУКТУРА КОМПЛЕКСА I

По данным электронной микроскопии Комплекс I из различных источников имеет L-образную форму и построен из двух крупных доменов (каждый из которых в свою очередь состоит из многих полипептидов), расположенных перпендикулярно друг к другу (рис. 1) [30, 57, 62, 63]. Периферический домен, представленный преимущественно относительно гидрофильными субъединицами, выступает из мембраны примерно на 150 Å в матрикс митохондрий, а в случае фер-

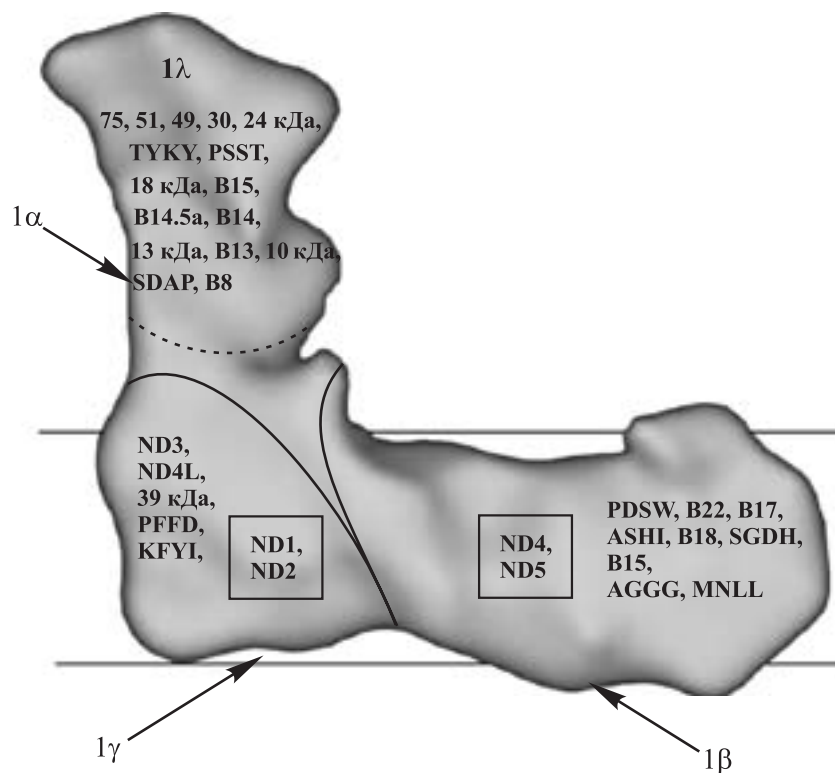


Рис. 1. Схематическое изображение структуры Комплекса I.

Контур поверхности белка приведены по данным реконструкции электронных микрофотографий фермента *N. crassa* [73]. Гидрофобный домен фермента погружен в липидный бислой (горизонтальные линии). Расположение отдельных субъединиц в мембранной и периферической частях фермента показано на основании результатов хроматографического разделения Комплекса I сердца быка на отдельные фрагменты [117]. Жирным шрифтом (в квадратах) выделены структурообразующие субъединицы гидрофобного домена.

мента бактерий – в цитоплазму бактериальной клетки. Здесь расположены центры связывания пиридиннуклеотидов и, по-видимому, большинство редокс компонентов фермента. Гидрофобный домен погружен в бислойную мембрану. Здесь, по всей вероятности, локализованы субъединицы, связывающие убихинон [73]. Линейные размеры мембранного и периферического доменов Комплекса I *N. crassa* и «упрощенного» бактериального фермента *Escherichia coli* приблизительно одинаковы (около 200 Å), а «объемы» ферментов сильно различаются: совмещение изображений показывает существенные различия размеров гидрофобных доменов [48]. Недавно было показано, что Комплекс I из *E. coli*\* в некоторых условиях может принимать другую форму, напоминающую подкову [17]. Вопрос о том, соответствует ли обнаруженная структура каталитически активной конформации фермента, остается открытым, так как при негативном контрастировании могут возникать искажения в изображении объекта, особенно, если исследуемый препарат представляет собой смесь полипептидов, липидов и детергента [17].

Несмотря на усилия нескольких исследовательских групп, до сих пор ни из одного источника не удалось получить очищенные препараты, пригодные для рентгенографического анализа. Сведения, касающиеся взаимного расположения субъединиц и локализации редокс-компонентов, получены, главным образом, в результате классического подхода: выделение очищенного препарата – разделение на отдельные компоненты – реконструкция. Впервые Комплекс I был выделен Хатефи и сотр. из митохондрий сердца быка (*Bos taurus*) [67]. Фермент, полученный из разрушенных митохондрий или субмитохондриальных частиц (СМЧ) солями желчных кислот с последующим фракционированием ацетатом аммония, оказался загрязнен другими компонентами дыхательной цепи (липидами, *b-c*<sub>7</sub> комплексом и цитохромоксидазой). Однако, на сегодняшний день это единственный препарат, способный катализировать NADH:убихинон-оксидоредуктазную реакцию со скоростями, соизмеримыми с активностью фермента в митохондриях, и чувствительную к специфическим ингибиторам: ротенону и пирицидину. В составе протеолипосом Комплекс I, полученный по методу Хатефи, способен создавать на фосфолипидной мембране разность электрохимических потенциалов ионов водорода  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  [106, 107]. Обработка изолированного Комплекса I хаотропными агентами (перхлорат натрия) приводит к

\* Далее в тексте для удобства мы будем использовать термин Комплекс I и для ферментов митохондрий, и для бактериальных протон-транслоцирующих NADH:убихинон-оксидоредуктаз Типа-1 (NDH-1).

его разделению на водорастворимую фракцию и нерастворимый осадок [51]. Растворимую фракцию можно далее разделить на два компонента. Один из них, растворимый флавопротеин FP (**F**lavo-**p**rotein), способен окислять NADH искусственными акцепторами электронов. По данным DSNa электрофореза в ПААГ он состоит из трех субъединиц с молекулярными массами 51, 24 и 10 кДа и содержит примерно один моль FMN и шесть атомов железа в расчете на молекулярную массу 90 кДа [50]. Другая часть водорастворимой фракции, получившая название железо-серного белка IP (**I**ron-**s**ulfur **P**rotein), содержит около 50 нмоль негемового железа/мг белка и не обладает никакой каталитической активностью [105]. В его составе найдены субъединицы с молекулярными массами 75, 49, 30, 20, 18, 15 и 13 кДа [90, 137]. Нерастворимый осадок, полученный после обработки Комплекса I перхлоратом натрия, также, как и IP-фрагмент не обладает каталитической активностью и представляет собой комплекс сильно гидрофобных белков HP (**H**ydrophobic **P**rotein) [51]. В состав HP входят не только гидрофобные субъединицы Комплекса I, но и некоторые глобулярные водорастворимые полипептиды, поэтому было бы ошибкой считать, что HP-фрагмент представлен целиком мембранным доменом фермента [136].

Другой препарат Комплекса I — фермент, выделенный в лаборатории Уокера [44]. Метод очистки основан на солюбилизации белков митохондриальной мембраны лаурилмальтозидом и последующем хроматографическом фракционировании. Выделенный по этому методу Комплекс I сердца быка представляет собой монодисперсный препарат с молекулярной массой около 900 кДа, определенной методом гель-фильтрации [117]. Если оценивать молекулярную массу этого фермента, считая, что все 46 субъединиц представлены в Комплексе I единичными копиями, то она составит 980 кДа [21]. Комплекс I *N. crassa* также получен в монодисперсном виде, его молекулярная масса близка к 700 кДа [83]. При электрофорезе в денатурирующих условиях в препарате Уокера обнаруживается тот же набор субъединиц, что и в Комплексе I, полученным Хатефи, при этом он не содержит примесей *b-c<sub>1</sub>*-комплекса и цитохромоксидазы. Существенным недостатком этого препарата является его низкая каталитическая активность, почти не чувствительная к ротенону и пирицидину. Обработка изолированного Комплекса I другим детергентом — *N,N*-диметил-додециламин-*N*-оксидом — приводит к его диссоциации на субкомплексы постоянного состава [44, 117]. Субкомплекс I $\alpha$  катализирует NADH:феррицианид-редуктазную и ротенон-нечувствительную NADH:Q<sub>1</sub>-редуктазную реакции и состоит по крайней мере из 22 гидрофильных субъединиц. Этот фрагмент содержит

почти все редокс-центры фермента, поэтому считают, что он представлен периферической частью L-структуры и частью мембранного домена. Небольшая модификация процедуры солюбилизации приводит к получению гидрофильного субкомплекса 1 $\lambda$ , который представлен лишь частью субкомплекса 1 $\alpha$  и состоит из 15 субъединиц [11, 43]. Этот фрагмент также обладает NADH:феррицианид-редуктазной активностью и содержит те же редокс-компоненты фермента, что и субкомплекс 1 $\alpha$ . Субкомплексы 1 $\beta$  (13 субъединиц) и 1 $\gamma$  (8 субъединиц), отделяющиеся при хроматографии от 1 $\alpha$  или 1 $\lambda$ , не содержат никаких простетических групп и не обладают каталитическими активностями [44, 117]. По-видимому они представлены полипептидами, образующими мембранный домен фермента.

Благодаря успешному применению молекулярно-биологических подходов и использованию масс-спектрометрии пептидов в настоящее время определены аминокислотные последовательности всех известных субъединиц Комплекса I митохондрий сердца быка [21, 40, 137] и 28 субъединиц Комплекса I *N. crassa* [132]. Аминокислотная последовательность субъединиц бактериальных ферментов стала известной после расшифровки структур оперонов бактерий *Paracoccus denitrificans*, *E. coli*, *Thermus thermophilus* и *Rhodobacter capsulatus*, кодирующих NDH-1 [33, 35, 140, 142–146, 151].

При обсуждении вопроса о принадлежности того или иного полипептида такому гигантскому образованию как Комплекс I всегда возникает некоторая неопределенность. Очевидно, что на такой вопрос можно было бы ответить с помощью «простого» опыта: если удаление некоторой субъединицы или ее замена дефектной копией с помощью приемов молекулярной генетики приводит к потере какой-либо активности фермента, которая может быть затем восстановлена реконструкцией, такой результат однозначно свидетельствовал бы о том, что эта субъединица – компонент Комплекса I. К сожалению, для фермента млекопитающих таких данных ни для одной «субъединицы» не получено, а результаты молекулярно-генетических манипуляций с ферментами дрожжей и прокариот весьма фрагментарны и в большинстве случаев приводят к дефектам сборки фермента. Ситуация несколько проще у прокариот, где Комплекс I (NDH-1) кодируется опероном, состоящим из 14 генов, тогда как у млекопитающих, дрожжей и *N. crassa* фермент представлен продуктами экспрессии как ядерных, так и митохондриальных генов. В связи с этим, о полипептидном составе Комплекса I приходится судить на основании сопоставления данных, полученных различными экспериментальными приемами. В качестве критериев того, что содержащийся в изолированном Комплексе I полипептид действительно

является субъединицей, обычно используют: *a)* его постоянное присутствие в препаратах Комплекса I, выделенных различными способами, *б)* увеличение его содержания в препарате по мере очистки, контролируемой, например, по содержанию FMN или каталитической активности и *в)* обнаружение гомологичных по аминокислотной последовательности полипептидов в Комплексе I из различных источников, например, из митохондрий *N. crassa* (35 субъединиц). «Консенсусный» полипептидный состав Комплексов I (или NDH-1) из наиболее полно изученных источников приведен в табл. 1. В таблицу не включены данные о структуре Комплексов I (или их гомологов), полученных из растений, однако есть все основания полагать, что гомологичные ферменты растений не менее сложны, чем те, которые приведены в табл. 1 [110].

Из 46 субъединиц Комплекса I сердца 7 кодируются митохондриальным геномом [27]. Эти субъединицы крайне гидрофобны, поэтому при электрофорезе препарата Комплекса I даже в денатурирующих условиях они выявляются в виде диффузных, плохо прокрашиваемых полос с аномальной зависимостью подвижности от молекулярной массы [136]. По аминокислотным последовательностям субъединиц ND1–ND6 и ND4L можно предсказать существование по крайней мере 51–53 участков, способных образовывать трансмембранные  $\alpha$ -спирали [136, 41]. Для всех субъединиц Комплекса I сердца быка, кодируемых митохондриальным геномом, найдены гомологи у фермента из *N. crassa*, а также у всех бактериальных препаратов Комплекса I [34, 128, 149].

Остальные 39 субъединиц кодируются в ядре, синтезируются в цитоплазме и транспортируются во внутреннюю мембрану митохондрий [136]. 13 кодируемых ядром субъединиц Комплекса I подвергаются посттрансляционной модификации, так как их молекулярная масса, рассчитанная по составу аминокислот секвенированием соответствующих *к*ДНК, немного отличается от молекулярной массы этих же субъединиц, определенной методом масс-спектрометрии (табл. 1) [136]. Если *N*-концевой остаток полипептида модифицирован, то такие субъединицы обозначают латинской буквой **В** с индексом, соответствующим молекулярной массе субъединицы, определенной методом электрофореза в ПААГ в денатурирующих условиях\*. В составе В22, В17.2, В17, В16,6, В15, В14,7, В14.5а,

\* Молекулярная масса, определенная таким способом, может отличаться от истинного значения, так как некоторые из субъединиц обладают аномальной подвижностью из-за высокой степени гидрофобности, а также из-за возможного взаимодействия с другими субъединицами даже в присутствии DSNa [136].



Таблица 1.  
**Полипептидный состав протон-транслоцирующих NADH:убихинон-оксидоредуктаз<sup>a</sup>**

№	<i>Bos taurus</i>			Гомологи у других NDH-1 (обозначения и молекулярные массы, кДа)			Возможные редокс- центры, лиганды, функция	
	Субъединица <sup>b</sup>	Молекулярная масса <sup>b</sup>	Посттрансляционная модификация полипептидной цепи	<i>Neurospora crassa</i> <sup>2</sup>	<i>Parasococcus denitrificans/Thermus thermophilus</i>	<i>Escherichia coli</i>		<i>Rhodobacter capsulatus</i>
1	2	3	4	5	6	6	7	8
1	75 IP	75 (77,0)		78 (+)	NQO3 (73,2/86,6)	NQOG (100,5)	NQOG (71,3)	[4Fe-4S] (N4); [2Fe-2S] (N1b)
2	51 FP	51 (48,4)		51 (+)	NQO1 (47,2/48,6)	NQOF (49,5)	NQOF (47,1)	NADH; [4Fe-4S] (N3)
3	<b>NDS</b>	50 (68,3)		<b>ND5</b> (78)	NQO12 (77,7/65,1)	NQOL (66,3)	NQOL (77,5)	Q
4	49 IP	49 (49,2)		49 (+)	NQO4 (46,7/46,4)	NQOCD (67,9)	NQOD (46,4)	Q
5	42	42 (36,7)		40 (+)				NAD(P)H
6	39	39 (39,1)		<b>ND4</b> (52)	NQO13 (56,4/49,4)	NQOM (56,7)	NQOM (55,8)	Q
7	<b>ND4</b>	39 (52,1)		30,4 (+)	NQO5 (23,7/23,9)	NQOCD (67,9)	NQOC (23,1)	Q
8	30 IP	30 (26,4)	N $\alpha$ -формил	<b>ND1</b> (42)	NQO8 (38,8/41,0)	NQOH (36,5)	NQOH (37,9)	Q
9	<b>ND1</b>	30 (35,7)	N $\alpha$ -формил	<b>ND2</b> (66)	NQO14 (52,5/45,0)	NQON (46,1)	NQON (50,1)	[2Fe-2S] (N1a)
10	<b>ND2</b>	30 (39,3)	N $\alpha$ -формил	24 (+)	NQO2 (26,1/20,3)	NQOE (18,6)	NQOE (41,3)	2x[4Fe-4S] (N2); Q
11	24 FP	24 (23,8)		21,3c(+)	NQO9 (19,0/20,1)	NQOI (20,6)	NQOI (18,8)	
12	TYKY	23 (20,2)		12,3 (+)				
13	PDSW	22 (20,8)						
14	B22	22 (21,7)	N $\alpha$ -ацетил					
15	PSST	20 (20,1)		19,3 (+)	NQO6 (19,1/20,2)	NQOB (25,1)	NQOB (19,5)	[4Fe-4S] (N2); Q
16	PGIV	19 (20,0)		20,8 (+)				Fe-S ?
17	ASHI	19 (18,7)		19				

см. продолжение табл. 1



1	2	3	4	5	6	6	7	8
18	<b>ND6</b>	не определены (18,1) 18 (15,3)	<i>N</i> $\alpha$ -формил	<b>ND6</b> (27)	NQO10 (21,8/18,6)	NQOJ (19.9)	NQOJ (21.7)	
19	18 IP			18,3				сАМР-зависимое фосфорилирование
20	B18	18 (16,5)	<i>N</i> $\alpha$ -миристил					
21	B17.2	17.2 (17,1)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил	13.4				
22	B16.6	16,6 (16,6)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил					апоптоз
23	ESSS	16,5 (14,5)						
24	B17	16,5 (15,4)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил					
25	SGDH	16 (16,7)						
26	15 IP	15 (12,5)						
27	<b>ND3</b>	15 (13,1)	<i>N</i> $\alpha$ -формил	<b>ND3</b> (17)	NQO7 (13,6/13,1)	NQQA (16.3)	NQQA (14.2)	A $\leftrightarrow$ D переход
28	B15	15 (15,1)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил					
29	B14.7	14,7	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил	21.3b (+)				A $\leftrightarrow$ D переход
30	B14.5a	14,5 (12,6)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил					
31	B14.5b	14,5 (14,1)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил					
32	B14	14 (15,0)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил	14.8				
33	13 IP	13 (10,5)		28.7				
34	B13	13 (13,2)	<i>N</i> $\alpha$ -ацетил	29,9 (+)				
35	B12	12 (11,0)	модифицирована					
36	<b>ND4L</b>	10 (10,8)	<i>N</i> $\alpha$ -формил	<b>ND4L</b> (10)	NQO11 (10,9/10,0)	NQOK (11.4)	NQOK (11)	
37	10 FP	10 (8,4)						
38	MLRQ	9 (9,3)						
39	B9	9 (9,2)	модифицирована	9.3				

см. окончание табл. 1

продолжение табл. 1

окончание табл. 1

1	2	3	4	5	6	6	7	8
40	B8	8 (11,0)	N $\alpha$ -ацетил	10.5				ацил-переносящий белок
41	SDAP	8 (10,1)	фосфопантоте- новая кислота	ACP (+)				
42	AGGG	7,9 (8,5)		9,8 (+)				
43	MWFE	7,5 (8,1)						
44	MNLL	7 (7,0)						
45	KFYI	6 (5,8)						
46		10,6 <sup>д</sup>						
				21.3a (+)				
				20.9 (+)				
				17.8				

<sup>a</sup> Сведения, суммированные в таблице, взяты из многочисленных источников, только часть которых упоминается в тексте и списке литературы, из-за экономии места мы не приводим здесь все источники.

<sup>б</sup> Субъединицы, кодируемые митохондриальным геномом, выделены жирным шрифтом. Об обозначениях, принятых для Комплекса I митохондрий сердца см. текст. В настоящее время нет единой системы для обозначения субъединиц прокариот. В литературе можно встретить 3 способа сокращения для субъединиц фермента: NUO (NADH:убихинон-оксидоредуктаза), NQR (NADH:хинон-редуктаза) и NQO (NADH:хинон-оксидоредуктаза, по нашему мнению наиболее удачное) с цифрами от 1 до 14 или буквами A-N в алфавитном порядке в соответствии с последовательностью генов в оперонах, кодирующих фермент.

<sup>в</sup> Молекулярные массы указаны либо в кДа (по данным электрофоретической подвижности), либо рассчитанные суммированием масс аминокислот, определенных по последовательности нуклеотидов в генах. Последние величины приведены в круглых скобках.

<sup>г</sup> Знаком (+) помечены субъединицы, для которых доступны специфические мутантные формы. Для последних трех субъединиц не найдены гомологи ни в составе фермента сердца, ни у прокариот.

<sup>д</sup> Эта субъединица пока не секвенирована, ее молекулярная масса определена масс-спектрометрией (точное значение – 10566 $\pm$ 2 Да).

В14.5b, В14, В13 и В8 найден ацетилованный *N*-концевой остаток аланина [11, 21, 40, 122, 136], *N*-концевой глицин в В18 связан с остатком миристиновой кислоты [136]. Предполагают, что в субъединице В12 помимо ацетилованного *N*-концевого остатка есть остаток метилированной аминокислоты [136]. Если *N*-концевой остаток не модифицирован, то для таких субъединиц принято обозначать четыре *N*-концевые аминокислоты, например, PSST [136]. Как видно из табл. 1, только 14 субъединиц митохондриального Комплекса I *B. taurus* и *N. crassa* (7 из которых кодируются митохондриями, а 7 – клеточным ядром) гомологичны пептидам бактериальных ферментов. Таким образом, ротенон-чувствительный перенос электронов от NADH на убихинон (реакция 1) в митохондриальном Комплексе I обеспечивается минимальным набором, состоящим из 13–14 субъединиц. Роль остальных субъединиц фермента в настоящее время не известна. Для выяснения возможной функции той или иной субъединицы Комплекса I были применены метод аффинного мечения аналогами субстратов (нуклеотида и хинонов), а также поиск в аминокислотных последовательностях субъединиц специфических «мотивов» (по аналогии с другими белками).

Как было упомянуто, FP фрагмент Комплекса I, состоящий из трех субъединиц, сохраняет каталитическую функцию и окисляет NADH искусственными акцепторами электронов. При облучении FP в присутствии фотоаффинных аналогов NAD<sup>+</sup> (азидо-производные β-аланил-NAD<sup>+</sup> или P<sup>32</sup>-меченный NAD<sup>+</sup>) происходит включение метки в 51 кДа субъединицу или гомологичную ей 50 кДа субъединицу фермента *P. denitrificans*, что дает основание считать, что NADH-связывающий центр фермента сформирован этой субъединицей [25, 29, 147]. В аминокислотной последовательности 51 кДа субъединицы Комплекса I сердца и всех ее гомологов обнаружен нуклеотид-связывающий мотив β-α-β, представленный последовательностями, характерными для чередования β-слоя, α-спирали и β-слоя [41, 136]. Считают, что структуры β-α-β с эволюционно закрепленным фрагментом, состоящим из трех остатков глицина, расположенных через один или два аминокислотных остатка, вовлечены в формирование АТФ-фиксирующего участка в NAD<sup>+</sup>-связывающих центрах некоторых дегидрогеназ. Мотивы связывания никотинамидной части кофермента в составе 51 кДа субъединицы не найдены [41, 136].

Еще один нуклеотид-связывающий мотив обнаружен в 39-кДа субъединице Комплекса I сердца быка [41, 136]. В аминокислотной последовательности этой субъединицы найдены участки, гомологичные семейству ферментов – NAD<sup>+</sup>-зависимых изомераз [41, 111, 136]. Предполагается, что субъединица с массой 39 кДа может участвовать

в трансгидрогеназной реакции  $\text{NADH} \rightarrow \text{NAD}^+$  (DD трансгидрогеназа), катализируемой Комплексом I [136]. Недавно в нашей лаборатории было показано, что FP-фрагмент Комплекса I катализирует DD-трансгидрогеназную реакцию с образованием тройного комплекса [152]. Эти данные свидетельствуют о том, что в составе трехсубъединичного фермента (51, 24 и 10 кДа) существует еще один нуклеотид-связывающий центр, специфичный к  $\text{NAD}^+$ . Не исключено, что 39-кДа субъединица участвует в гипотетическом «туннелировании»  $\text{NADH}$  от активных центров  $\text{NAD}^+$ -зависимых дегидрогеназ матрикса к активному центру Комплекса I. Описаны условия, в которых Комплекс I образует комплексы с  $\text{NAD}^+$ -зависимыми дегидрогеназами митохондриального матрикса [127].

При окислении  $\text{NADH}$  FP-фрагмент Комплекса I восстанавливается, и первичным акцептором электронов считают молекулу FMN, содержание которого составляет 1 моль/моль FP. Хотя место связывания FMN в трехсубъединичном фрагменте неизвестно, предполагают, что в его связывании участвует последовательность аминокислот 180–234 51 кДа субъединицы Комплекса I\* [136]. Исследование Комплекса I *N. crassa* с дефектной копией 51 кДа субъединицы показало, что изолированный фермент мутанта *nuo51* теряет способность катализировать  $\text{NADH}$ :феррицианид-редуктазную реакцию и не содержит FMN [42]. В 51 кДа субъединице Комплекса I найден также мотив, характерный для связывания тетраядерного железо-серного кластера [136]. Этот кластер исчезает в Комплексе I, выделенном из мутанта *nuo51 N. crassa* [42]. Таким образом считают, что связывание  $\text{NADH}$ , FMN и одного железо-серного кластера [4Fe-4S] (N3) осуществляется субъединицей с массой 51 кДа [41, 136].

Методом низкотемпературной ЭПР-спектроскопии в составе Комплекса I из различных источников обнаружено несколько железо-серных кластеров [15, 97, 100, 124]. Как биядерные, так и тетраядерные кластеры образованы атомами железа, связанными между собой мостиками неорганической кислото-лабильной серы. К белку кластеры обычно присоединяются координационными связями атомов железа с цистеиновыми остатками полипептидной цепи или другими аминокислотами, например, гистидином [56]. Остатки цистеина, принимающие участие в связывании железо-

---

\* В недавно вышедшей работе Албрахта и соавт. приведены данные, свидетельствующие о том, что в составе Комплекса I из сердца быка содержание FMN составляет 2 моля/моль фермента. На этом основании авторы предложили схему, согласно которой в составе фермента помимо 51 кДа субъединицы есть еще один участок связывания FMN, осуществляющий окисление  $\text{NADPH}$  [7].

серных центров, располагаются в характерных последовательностях-мотивах. В субъединицах Комплекса I обнаружено до 8 таких мотивов [98]. Общепринято, что Комплекс I сердца быка содержит три тетраядерных железо-серных кластера [4Fe-4S]: N2, N3 и N4\*, содержание каждого из них примерно равно содержанию FMN. Кроме того в состав фермента входит двуядерный железо-серный кластер [2Fe-2S], который для фермента *N. crassa* обозначают как N1, а для Комплекса I сердца – N1b. По поводу содержания кластера N1b в ферменте млекопитающих единого мнения нет. Ониши и соавт. [97] оценивают эту величину как 1 моль/моль FMN (или на один центр N2), в то время как Албрахт и соавт. [8,9] считают ее равной 0,5. Кроме того в Комплексе I сердца быка обнаружены двуядерный кластер N1a [99] и четырехядерный кластер N5 [96,114], которые не найдены в ферменте *N. crassa* [139]. Принадлежность последнего кластера Комплексу I окончательно не доказана, так как его содержание составляет всего 0,25 моль/моль FMN [15]. На основании результатов направленного мутагенеза *R. capsulatus* [26] и *E. coli* [49] были предложены две модели связывания различных железо-серных кластеров субъединицами Комплекса I. Чтобы выяснить, какая из них соответствует действительности, требуются дополнительные эксперименты. Обсуждается возможность того, что еще два не обнаруживаемых методом ЭПР железо-серных кластера могут находиться в субъединице PGIV, содержащей 8 остатков цистеина [37].

Так как природный убихинон чрезвычайно гидрофобен, общепринято, что место его связывания расположено в мембранном домене фермента. В пользу этого свидетельствует и тот факт, что многочисленные ингибиторы переноса электронов от железо-серных центров к убихинону либо гидрофобны [39, 59, 74], либо обладают выраженной амфипатией, например, различные детергенты: тритон X-100 [64, 130], бридж-35 и тезит [102]. На сегодняшний день о локализации и количестве хинон-связывающих центров в Комплексе I известно очень мало. В составе фермента обнаружены, по крайней мере, 2 типа прочно связанного убисемихинона [86, 135], возможно также существуют участки взаимодействия со свободным убихиноном дыхательной цепи. Специфическое включение меченных фотоаффинных аналогов ротенона [38], пиридабена [121] и фенпироксимата [94] (все эти соединения блокируют восстановление эндогенного и добавленного хинонов-акцепторов) указывает на возможное участие субъединиц ND1, PSST и ND5 соответственно в связывании убихинона. Опыты по направленному мутагенезу субъединиц бактериального

---

\* Обозначения, предложенные Ониши [96].

фермента *R. capsulatus* позволили предположить, что в мембране бактерий гидрофильный домен Комплекса I соединен с мембранной частью фермента участком, сформированным субъединицами NQOB (гомолог в сердце быка – субъединица PSST) и NQOD (гомолог в сердце быка – субъединица 49 кДа фрагмента IP). Со стороны мембранной части в этом связывании участвует субъединица NQOH (гомолог в сердце быка – субъединица ND1). Эти субъединицы могут формировать место связывания убихинона [36, 104]. Мутагенез Комплекса I дрожжей *Yarrowia lipolytica* указывает на участие субъединиц PSST и TҮKY (обе содержат мотивы, характерные для железо-серных кластеров) в связывании убихинона [6]. Другой подход к проблеме – поиск мотивов, гомологичных аминокислотным последовательностям в пептидах, формирующих участки связывания хинонов в бактериальных реакционных центрах и в Комплексе III. Обнаружена небольшая гомология этих структур с участками субъединиц ND4 и ND5 [45]. Таким образом, на роль убихинон-связывающих центров Комплекса I могут претендовать субъединицы ND1, ND4, ND5, PSST, TҮKY и 49 кДа (IP).

Функции большинства субъединиц остаются неизвестными. Однако, уже сейчас ясно, что Комплекс I помимо основной – переноса электронов, сопряженного с генерацией  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  – может выполнять и другие функции. В составе Комплекса I сердца быка и *N. crassa* обнаружена субъединица SDAP, которая идентична ацил-переносающему белку системы биосинтеза жирных кислот [20, 113]. В ее составе обнаружен остаток фосфопантотеновой кислоты. Роль субъединицы SDAP в Комплексе I не ясна, однако показано, что ее замена мутантной копией приводит к полному предотвращению формирования фермента у *N. crassa* [120].

Субъединица MWFE, состоящая всего из 70 аминокислот, по-видимому, располагается в мембранной части фермента. Недавно в клетках китайского хомячка была найдена мутантная форма фермента, обусловленная делецией гена, кодирующего MWFE субъединицу дыхательной цепи митохондрий. Мутация приводила к синтезу укороченной полипептидной цепи MWFE, при этом клетки теряли способность катализировать ротенон-чувствительное NADH-зависимое окисление малата в присутствии глутамата. Трансфекция мутантных клеток нормальным геном приводила к восстановлению этой активности [13]. На основании этих данных авторы считают, что субъединица MWFE необходима для проявления каталитической активности Комплекса I в митохондриях эукариот.

Субъединица 18 кДа фрагмента IP в своей С-концевой части содержит последовательность RVS, характерную для пептидов, которые могут фосфорилироваться cAMP-зависимыми протеинкиназами. Повышение внутриклеточного уровня cAMP в культуре фибробластов мыши, вызванное добавлением холерного токсина, приводило к фосфорилированию 18 кДа субъединицы Комплекса I и повышению скорости ротенон-чувствительного  $\text{NAD}^+$ -зависимого дыхания клеток приблизительно в 2,5 раза. Иммунохимическими методами в матриксе и внутренней мембране митохондрий сердца быка были обнаружены активности cAMP-зависимой протеинкиназы и серин/треонин фосфатазы PP2C $\gamma$ -типа [103]. Изучение мутантных форм Комплекса I с различными дефектами гена, кодирующего 18 кДа субъединицу, позволило авторам работы предположить, что ее возможной функцией может быть регулирование каталитической активности фермента, а также контроль за его правильной сборкой [103].

Зрелая форма субъединицы B16.6, входящая в состав гидрофильного домена Комплекса I и недавно обнаруженная в субкомплексе фермента 1 $\lambda$ , ацетилирована по N-концевому остатку аланина. Последовательность аминокислот этой субъединицы на 83% совпадает с белком GRIM-19 человека, относящегося к семейству белков-продуктов генов, вовлеченных в апоптоз, вызываемый ретиноевой кислотой и  $\beta$ -интерфероном, откуда он и получил свое название GRIM (gene associated with retinoid interferon-induced mortality) [40].

Совсем недавно в составе субкомплекса 1 $\alpha$  найдена новая субъединица B14,7, гомологичная 21,3b субъединице Комплекса I из *N. crassa*, локализованной, как полагают, в мембранном домене фермента. Оба полипептида обладают сходным профилем гидрофобности. N-концевой аланин субъединицы B14,7 ацетилирован, а ее аминокислотная последовательность на 72% и 65% идентична двум белкам человека и мыши, соответственно, функции которых неизвестны [21]. Кроме того, найдена гомология этой субъединицы с белками Tim17, Tim22 и Tim23, принимающими участие в транспорте белков через внутреннюю мембрану митохондрий. Профиль гидрофобности субъединицы B14,7, также как и субъединицы 21,3b *N. crassa*, похож на профиль гидрофобности Tim17, Tim22 и Tim23: каждый имеет четыре трансмембранные спирали [21]. Не исключено, что субъединица B14,7 фермента может быть вовлечена в импорт 13 субъединиц Комплекса I, относящихся к группе В (ядерный геном) и не имеющих в своем составе сигнальных (адресных) последовательностей [21].



Другая «новая» субъединица Комплекса I – ESSS с молекулярной массой ~14,5 кДа гомологична нейрональным белкам NP15,6 мыши и NP17,3 человека [21].

Опыты по разделению мембранного домена Комплекса I из сердца быка, выделенного по методу Уокера, и определению субъединичного состава субкомплексов фермента, привели к созданию модели структурной организации фермента, которая изображена на рис. 1. Согласно этой модели внутри мембранного домена находятся два центра, формируемые вокруг субъединиц ND1-ND2 и ND4-ND5. Точное расположение других субъединиц Комплекса I пока неизвестно [117].

### **III. КАТАЛИТИЧЕСКИЕ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА I И ОБРАТИМОСТЬ NADH:УБИХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗНОЙ РЕАКЦИИ**

Каталитические свойства Комплекса I обычно изучают либо на солюбилизированных препаратах фермента, либо на препаратах СМЧ, полученных ультразвуковой обработкой митохондрий (чаще всего – митохондрий сердца быка). В СМЧ (по крайней мере значительной их части) активный центр Комплекса I ориентирован так, что доступен для экзогенного NADH. Кроме того, частицы не содержат большинства NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ и других ферментов цикла трикарбоновых кислот, но содержат все компоненты дыхательной цепи, включая водорастворимый цитохром c, который оказывается внутри частиц. В процессе получения СМЧ во время ультразвуковой обработки фактор F<sub>1</sub>F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФ-синтетазного комплекса частично диссоциирует. В результате препараты имеют высокую проводимость мембраны для протонов (через протонный канал F<sub>o</sub>) и оказываются полностью разобщенными. Такие СМЧ не способны катализировать реакции, сопряженные с образованием или использованием  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ , однако, сопряжение может быть достигнуто при добавлении специфических ингибиторов протонного канала F<sub>o</sub>F<sub>1</sub>-АТФазы, олигомицина или дициклогексилкарбодиимида [81]. Искусственно сопряженные СМЧ, выделенные по методу, применяемому в нашей лаборатории, при окислении различных субстратов входят в состояние дыхательного контроля, который в NADH-оксидазной реакции составляет величину от 5 до 7 [3]. При этом на мембране частиц создается  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ , который может быть использован для целого ряда эндергонических реакций (синтез АТФ, обратный перенос электронов и др.). Использование прочно сопряженных СМЧ позволяет изучать каталитические свойства Комплекса I в усло-

виях, приближенных к тем, в которых он функционирует в интактных митохондриях\*.

Как мы обсудим ниже, почти все препараты Комплекса I гетерогенны и представлены смесью активной и «деактивированной» форм. В этом разделе нашего обзора речь пойдет о каталитических активностях полностью активного Комплекса I. В составе дыхательной цепи митохондрий или СМЧ фермент катализирует начальный этап окисления NADH. Естественным акцептором электронов в этой реакции служит второй субстрат фермента – убинон (в сердце быка – коэнзим Q<sub>10</sub>)\*\*. Убинон занимает особое место среди дыхательных переносчиков. Будучи низкомолекулярным гидрофобным соединением, весь убинон находится в мембране, при этом его содержание намного превышает содержание всех других комплексов дыхательной цепи. Это позволяет убинону акцептировать электроны сразу от нескольких дегидрогеназ, например, от сукцинат:убинон-оксидоредуктазы (Комплекса II) или от дегидрогеназ, принимающих участие в окислении жирных кислот. Образующийся убинол далее окисляется в цепи реакций: Комплекс III → цитохром c → цитохромоксидаза (Комплекс IV) → молекулярный кислород. Число оборотов Комплекса I при протекании NADH-оксидазной реакции в составе полностью разобщенных СМЧ сердца быка составляет величину около  $1 \cdot 10^4$  мин<sup>-1</sup> при 25 °С [79]. При стационарном окислении NADH даже в полностью разобщенном препарате СМЧ все железосерные центры фермента почти полностью восстановлены [14], и

---

\* Нам представляется очевидным, что изучение молекулярных механизмов реакции (1) может быть продуктивно только тогда, когда в качестве объекта используются препараты, способные к генерации мембранного потенциала. Достаточно трудоемкие и требующие биохимической «культуры» методы получения таких препаратов были разработаны в 60<sup>е</sup>–70<sup>е</sup> годы. Последние годы можно охарактеризовать как техническую революцию в биохимии, обусловленную широким внедрением в практику мощных новых автоматизированных методов: полимеразная цепная реакция, масс-спектрометрия пептидов и белков, хромотография высокого давления. Их применение привело к впечатляющим успехам в области статической биохимии. С другой стороны, многие методические приемы, рутинно применявшиеся во многих биоэнергетических лабораториях 20–30 лет тому назад, постепенно оказываются утраченными. К ним, в частности, относится получение прочно-сопряженных СМЧ. На сегодняшний день наша группа оказалась среди очень немногих в мире, способных получать препараты частиц с высоким дыхательным контролем.

\*\* Комплекс I, восстановленный либо NADH, либо убинолом (в реакции обратного переноса электронов), также может напрямую реагировать с молекулярным кислородом, что приводит к генерации супероксид-радикала. Эту реакцию мы обсудим ниже.

лимитирующей стадией всего процесса является окисление фермента убихиноном [3]. Специфические ингибиторы Комплекса I ротенон и пиерицидин практически полностью блокируют NADH-оксидазную реакцию [68], остаточная активность фермента в присутствии этих соединений составляет величины порядка десятых долей процента и, по-видимому, обусловлена образованием супероксид-аниона при прямом окислении Комплекса I молекулярным кислородом. Очень многие гидрофобные соединения различной структуры блокируют перенос электронов в NADH:убихинон-оксидоредуктазном участке дыхательной цепи сходным с ротеноном и пиерицидином способом [28]. NADH-оксидазная активность СМЧ тормозится ингибиторами Комплекса III (антимисин А, миксотиазол и др.) и ингибиторами цитохромоксидазы (цианид, азид).

При изучении собственно NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции, катализируемой Комплексом I, в среду измерения добавляют ингибиторы Комплекса III или IV, а в качестве акцептора электронов используют водорастворимые гомологи природного убихинона ( $Q_0$ ,  $Q_1$  или  $Q_2$ ) или его аналоги (пентил-убихинон, децил-убихинон и дурухинон) [119, 138]. Окисление NADH искусственными хинонами-акцепторами в интактных митохондриях [80], СМЧ [70], а также в реконструированной системе (протеолипосомы) [106] сопровождается трансмембранным переносом протонов и генерацией  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ .

Каким образом искусственные водорастворимые хиноны реагируют с ферментом, неизвестно. Существуют по крайней мере два варианта взаимодействия добавленных акцепторов с восстановленным ферментом. Комплекс I может восстанавливать только природный убихинон, который затем окисляется водорастворимыми хинонами. Более вероятно, однако, что водорастворимые хиноны непосредственно взаимодействуют с хинон-связывающим центром Комплекса I, из которого они вытесняют убихинон. Окисление добавленными хинонами NADH так же, как NADH-оксидазная реакция, чувствительно к ротенону и пиерицидину, но степень торможения существенно меньше и зависит от ряда факторов (химической структуры хинонов-акцепторов и их концентрации, состава и температуры среды измерения активности) [112]. Природа ротенон-нечувствительной составляющей реакции неизвестна. Возможно, что перенос электронов в этом случае происходит при участии одного из многих редокс центров фермента, который в отсутствие ингибиторов не реагирует с хиноном-акцептором. При таком рассмотрении следует считать, что ротенон, пиерицидин и другие специфические ингибиторы «индуцируют» не чувствительную к ним хинон-редуктазную

реакцию, изменяя конформацию фермента таким образом, что один или несколько редокс-компонентов *становятся* доступными для искусственных акцепторов. В пользу такой точки зрения могут служить данные об изменении структуры фермента (изменение картины «сшивок» бифункциональными реагентами) в присутствии ротенона [54] или структурные изменения Комплекса I при его деактивации (см. ниже).

Изолированный Комплекс I и фермент в составе СМЧ реагирует и с другими искусственными акцепторами электронов: феррицианидом [31] и гексааминорутением (III) [52, 126]. Эти реакции не чувствительны к ротенону и пирицидину и не сопровождаются генерацией мембранного потенциала. Способностью восстанавливать искусственные акцепторы электронов обладает и простейший каталитически активный фрагмент Комплекса I флавопротеин FP [32, 52, 69]. Так как железо-серные кластеры FP не восстанавливаются при добавлении NADH, можно думать, что первичным акцептором электронов в Комплексе I служит FMN [3].

К реакции с искусственными акцепторами электронов можно отнести и способность Комплекса I в некоторых условиях переносить электроны на молекулярный кислород с образованием супероксид-радикала  $O_2^{\bullet-}$ . Образовавшийся супероксид-анион подвергается ряду превращений, в результате чего в клетке появляются такие активные формы кислорода (АФК), как перекись водорода  $H_2O_2$  и гидроксил-радикал ( $OH^{\bullet}$ ) [18]. АФК могут вызывать в клетке различные повреждения, затрагивающие нуклеиновые кислоты, в частности митохондриальную ДНК, белки и фосфолипиды мембраны. В последнее время этому процессу уделяется много внимания в связи с предполагаемым участием АФК в регулировании клеточных процессов, в программируемой клеточной смерти и в развитии серьезных патологических состояний [10, 71, 82, 116, 118]\*. Полагают, что Комплекс I является одним из основных источников АФК в клетке [24]. Механизм генерации супероксид-аниона ферментом в настоящее время неизвестен; все редокс-компоненты Комплекса I потенциально способны участвовать в этом процессе [47, 78, 89]. Однако не следует переоценивать процесс генерации супероксид-аниона в клетке, так как даже на очищенных системах (СМЧ сердца быка) скорость образования  $O_2^{\bullet-}$  не превышает долей процента от максимальной активности дыхатель-

---

\* Гипотезы о физиологическом значении генерации супероксид-радикала Комплексом I, по нашему мнению, не имеют под собой хорошо доказанных экспериментальных оснований. Эта проблема могла бы быть предметом специального обзора.

ной цепи [3]. Более того, такие низкие скорости наблюдаются даже при атмосферном парциальном давлении кислорода, и, если окисление Комплекса I кислородом происходит в простой бимолекулярной реакции, следует ожидать, что в подавляющем большинстве тканей, где концентрация кислорода существенно меньше, чем в крови, эта реакция, если и протекает, то с очень малыми скоростями. Нельзя исключить, что Комплекс I имеет специальный центр связывания молекулярного кислорода, что конечно изменит ситуацию. Существование такого центра было бы прямым указанием на физиологическую роль Комплекса I в генерации супероксид-радикала. В то же время к косвенным указаниям на важность АФК можно отнести существование в клетке целой системы «антиоксидантной» защиты: супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза и каталаза [16, 95, 129].

Комплекс I катализирует трансгидрогеназную реакцию, осуществляя прямой перенос гидрид-иона между NADH и его окисленным аналогом ацетилпиридин-NAD<sup>+</sup> [68, 108]. Эту реакцию катализирует и минимальный фрагмент Комплекса I FP, обладающий NADH-дегидрогеназной активностью [66]. Не исключено, что в трансгидрогеназной реакции участвует FMN, среднеточечный редокс-потенциал которого в молекуле Комплекса I и FP очень близок к потенциалу пары NADH/NAD<sup>+</sup> [125, 126].

В начале 60-х годов в лабораториях Чанса [23] и Клингенберга [75] было независимо показано, что добавление к прочно сопряженным митохондриям сукцината или  $\alpha$ -глицерофосфата – субстратов, окисляющихся убихиноном, – приводит к восстановлению внутримитохондриальных пиридиннуклеотидов. Такое восстановление оказалось чувствительным к разобщителям окислительного фосфорилирования. В результате детального анализа этого явления было доказано, что в определенных условиях Комплекс I катализирует убихинол:NAD<sup>+</sup>-оксидоредуктазную реакцию, получившую жаргонное название «обратный перенос электронов». Этот процесс можно наблюдать, например, при окислении дыхательной цепью сукцината (так называемый аэробный, поддерживаемый окислением сукцината обратный перенос электронов). Генерация  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  в этом случае обусловлена активностью Комплексов III и IV, кроме того, при окислении сукцината образуется убихинол, субстрат-донор для реакции обратного переноса.  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$  на мембране митохондрий или СМЧ может быть создан и за счет гидролиза АТФ сопряженной митохондриальной F<sub>0</sub>F<sub>1</sub>-АТФазой. Для наблюдения этой реакции также необходимо присутствие сукцината, при окислении которого образуется убихинол, и ингибиторов Комплексов III или IV, предотвращающих окисление образующегося NADH [3]. Активность Комплекса I в обратной

реакции примерно равна максимальной скорости окисления NADH в состоянии дыхательного контроля прочно сопряженных СМЧ, и составляет приблизительно четверть от скорости разобщенного дыхания СМЧ [79]. В качестве акцепторов электронов от убихинола в этой реакции можно использовать либо природный субстрат  $\text{NAD}^+$ , либо искусственный акцептор электронов феррицианид [72, 79]. Считается, что в последнем случае донором электронов для феррицианида является тот же редокс-компонент фермента, что и в NADH:феррицианид-редуктазной реакции (предположительно FMN) [3].

При регистрации аэробного сукцинат-зависимого обратного переноса электронов скорость образования NADH довольно быстро снижается и система приходит к стационарному состоянию, при котором скорости синтеза NADH в реакции обратного переноса электронов и скорости его окисления дыхательной цепью выравниваются.

К концу прошлого века накопилось достаточное количество указаний на то, что каталитические свойства Комплекса I не укладываются в простую модель строения фермента с одним нуклеотид-связывающим и с одним хинон-связывающим центром. В табл. 2 приведены некоторые параметры взаимодействия Комплекса I в составе СМЧ сердца для окисленной и восстановленной форм  $\text{NAD}^+$ . Кажущаяся  $K_m$  для NADH примерно равна 2–7 мкМ как для NADH-оксидазной, так и NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции [58, 133, 153]. Эти величины почти не зависят от того, есть ли на мембране

Таблица 2  
**Кинетические параметры связывания субстратов, продуктов и ингибиторов в прямой и обратной реакциях, катализируемых Комплексом I в СМЧ сердца быка<sup>a</sup>**

Субстрат (ингибитор)	NADH-оксидазная реакция		Обратный перенос <sup>b</sup>
	сопряженная	разобщенная	
NADH	1,4 ( $K_m$ )	2,2 ( $K_m$ )	40 ( $K_i$ )
$\text{NAD}^+$	1100 ( $K_i$ )	1200 ( $K_i$ )	7,2 ( $K_m$ )
ADP-рибоза	24 ( $K_i$ )	25 ( $K_i$ )	не ингибирует
Ротенон	0,001 ( $K_i$ )	0,001 ( $K_i$ )	0,02 ( $K_i$ )
Тритон X-100		10 ( $K_i$ )	50 ( $K_i$ )
Лаурилсульфат		50 ( $K_i$ )	10 ( $K_i$ )

<sup>a</sup> Величины кажущегося сродства ( $K_m$  и  $K_i$ ) указаны в мкМ ( $10^{-6}$  М).

<sup>b</sup>  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$ -зависимая аэробная сукцинат(убихинол): $\text{NAD}^+$ -оксидоредуктазная реакция.

СМЧ  $\Delta\tilde{\mu}_{H^+}$ . В то же время сродство фермента к NADH в качестве конкурентного ингибитора реакции обратного переноса существенно ниже:  $K_i$  равна 40 мкМ [133]. Аналогичная ситуация сохраняется и для окисленной формы  $NAD^+$ :  $K_m$  для  $NAD^+$  в реакции обратного переноса электронов на порядок ниже, чем  $K_i$  для  $NAD^+$  в NADH-оксидазной реакции, где  $NAD^+$  очень слабо тормозит реакцию по конкурентному механизму [133]. Данные, приведенные в табл. 2, позволяют думать о существовании, по крайней мере, двух нуклеотид-связывающих центров в ферменте. Для такого предположения есть и структурные основания: нуклеотид-связывающие мотивы обнаружены в субъединицах 51 кДа (FP) и 39 кДа [41, 136], а при использовании фотореактивных меток-производных пиридиннуклеотидов в молекуле фермента недавно обнаружено до 5 (!) мест связывания [150]. В этой связи интересны результаты изучения кинетического механизма трансгидрогеназной реакции, полученные в нашей лаборатории. Как Комплекс I в составе СМЧ, так и каталитически активный фрагмент фермента FP катализируют  $NADH \rightarrow$  ацетилпирин-NAD<sup>+</sup> трансгидрогеназную реакцию с образованием тройного комплекса, что свидетельствует о том, что при протекании этой реакции функционируют два нуклеотид-связывающих центра [4, 152].

При изучении действия различных ингибиторов на активность Комплекса I нами были обнаружены такие, которые действуют «односторонне». Так ADP-рибоза, ингибирующая NADH-оксидазную и NADH:убихинон-редуктазную активности фермента конкурентно по отношению к субстрату (NADH), вовсе не влияет на скорость обратного переноса электронов (см. табл. 2) [153]. Добавление ADP-рибозы к СМЧ, катализирующим аэробный обратный перенос электронов в стационарном состоянии (см. выше) приводит к повышению уровня восстановленности  $NAD^+$  [153]. Если Комплекс I преинкубировать с фотоаффинным производным ADP-рибозы, то это приводит к полному блокированию NADH-оксидазной активности СМЧ (прямая реакция), при этом фермент сохраняет способность катализировать обратный перенос электронов на  $NAD^+$  [46]. Эти результаты позволили нам предположить, что прямая и обратная реакции, катализируемые Комплексом I, происходят при участии *различных* нуклеотид-связывающих центров. Следует еще раз отметить, что данные о кинетике трансгидрогеназной реакции, катализируемой FP-фрагментом Комплекса I, указывают на существование двух центров на субъединицах 51, 24 и 10 кДа [152].

Некоторые ингибиторы хинон-связывающего участка Комплекса I действуют на фермент сходным с ADP-рибозой образом (см. табл. 2). Ротенон блокирует NADH-оксидазную реакцию СМЧ с очень



высоким сродством ( $K_i = 1$  нМ), тогда как реакция обратного переноса электронов тормозится более высокими концентрациями ингибитора ( $K_i = 20$  нМ) [59]. Аналогичным образом действует другой специфический ингибитор фермента – неионный детергент тритон X-100. Для торможения реакции обратного переноса электронов необходимы высокие концентрации ингибитора ( $K_i = 50$  мкМ), тогда как NADH-оксидазная активность ингибируется с  $K_i$ , равной 10 мкМ [130]. Гипотеза о различии путей протекания прямой и обратной реакций, катализируемых Комплексом I, приводит к предсказанию: наряду с «односторонними» ингибиторами окисления NADH убихиноном должны существовать «односторонние» ингибиторы и для восстановления  $\text{NAD}^+$  убихинолом. Недавно в нашей лаборатории был обнаружен такой ингибитор: анионный детергент лаурил-сульфат натрия в микромолярных концентрациях не влияет на NADH-оксидазную активность СМЧ и специфически подавляет реакцию обратного переноса электронов [61]. Такой результат мог бы показаться тривиальным: любое соединение, добавление которого снижает  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$  или ингибирует активность сукцинатоксидазы, должно снизить скорость обратного переноса. Однако, детальный анализ показал, что лаурилсульфат в использованных концентрациях не является ни разобщителем, ни ингибитором окисления сукцината. Таким образом, имеются экспериментальные указания на существование отдельных хинон- и хинол-связывающих центров в Комплексе I, а реакции прямого и обратного переноса электронов, катализируемые Комплексом I, протекают, по крайней мере, частично различающимися путями. Здесь уместно напомнить, что принцип «одностороннего движения» широко используется в биологических системах разной степени сложности. Так пути синтеза органических соединений («анаболизм») не есть простое обращение реакций их распада («катаболизм», левая часть рис. 2). Более того, «обращение» одного и того же метаболического пути, особенно там, где необходимо преодоление термодинамических барьеров, обеспечивается функционированием разных наборов ферментов: яркий пример – существование в одном и том же органе киназы 6-фосфофруктозы, необходимой для протекания гликолиза, и фосфатазы 1,6-бисфосфофруктозы, необходимой для гликонеогенеза (средняя часть рис. 2). Другой пример – экспрессия разных генов, кодирующих сукцинат:хинон-редуктазный (сукцинатдегидрогеназа) и (или) хинол:фумарат-редуктазный (фумаратредуктаза) комплексы при выращивании *E. coli* в аэробных или анаэробных условиях [22]. Недавно появилось сообщение о разных *b-c*<sub>1</sub> комплексах, экспрессируемых железосерной бактерией *Acidithiobacillus ferrooxidans*, катализирующих прямую и

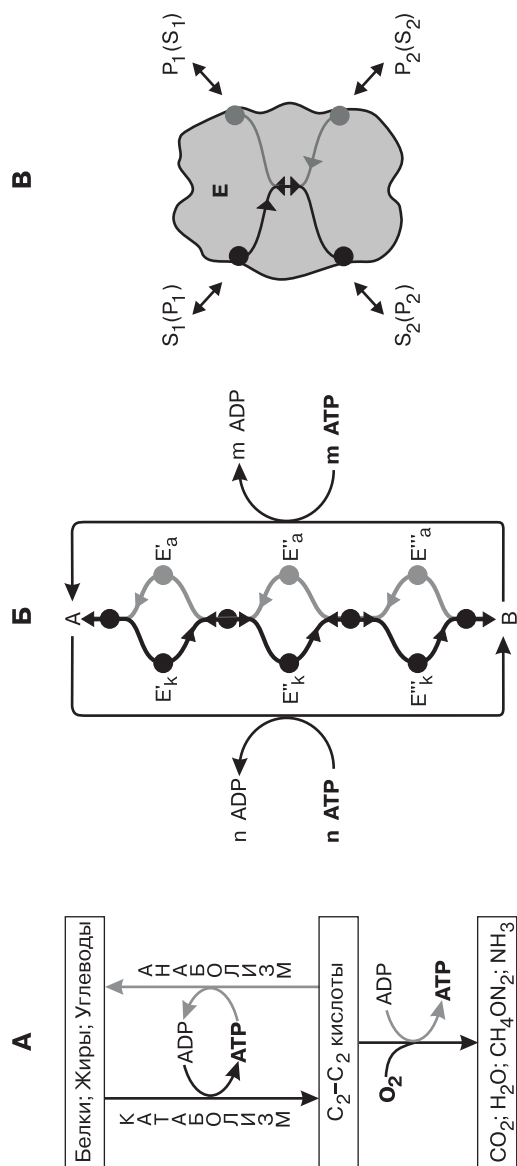


Рис. 2. Принцип «одностороннего движения» при катализе в биологических системах.

А. Различные пути синтеза и распада органических соединений (анаболизм и катаболизм) с участием различных ферментов и связанные между собой реакциями синтеза и распада АТФ.

Б. В цепи превращений  $A \leftrightarrow B$  некоторые метаболические процессы (например, гликолитический распад и синтез глюкозы) протекают частично различающимися путями ( $m > n$ ).

В. «Прямая» ( $S_1 + S_2 \rightarrow P_1 + P_2$ ) и «обратная» ( $P_1 + P_2 \rightarrow S_1 + S_2$ ) реакции, катализируемые одним ферментом (E), протекают частично различающимися путями. Обсуждение – см. текст.

обратную реакцию переноса электронов [19]. Похоже, что принцип «одностороннего движения» можно распространить и на «индивидуальные» ферменты достаточно сложного строения (правая часть рис. 2), такие, например, как Комплекс I или протон-транслоцирующая АТФ-синтетаза [1, 134]: в зависимости от физиологических условий фермент катализирует прямую или обратную реакцию и эти реакции протекают по *разным* путям (механизмам). Разумеется, что для этого необходимо, чтобы в составе таких ферментов-машин был специальный «переключатель» направления реакции. Простейшим механизмом «переключения» может быть разделение специфических центров связывания субстратов и продуктов реакции. Такая гипотеза, на первый взгляд, может показаться противоречащей принципу микрообратимости химических реакций – в энзимологии этот «принцип» количественно характеризуют соотношением Холдейна [5, 65]. Следует, однако, иметь в виду, что такие гигантские образования, как Комплекс I или АТФ-синтетаза – молекулярные «машины», вполне допускающие существование клапанов, переключателей и прочих механических элементов, обеспечивающих их однонаправленное функционирование.

Физиологическое значение реакции обратного переноса электронов неизвестно. Одна из возможных функций – «универсализация» восстановительных эквивалентов, образующихся при протекании окислительных реакций в митохондриях (первое дегидрирование при  $\beta$ -окислении жирных кислот, окисление  $\alpha$ -глицерофосфата и других субстратов убихинон-зависимых дегидрогеназ) в виде NADH. Здесь мы хотим предложить другую гипотезу.

Окисление NADH и восстановление убихинона приводят к возникновению на внутренней мембране митохондрий  $\Delta\psi_{H^+}$ , и есть все основания полагать, что в физиологических условиях протекают как прямая, так и обратная реакции. *Если* эти реакции протекают даже частично различающимися путями, они образуют футильный цикл. Достаточно допустить существование в митохондриях природных соединений, способных влиять на активность Комплекса I как односторонние ингибиторы (или активаторы), чтобы обеспечить возможность для тонкого и весьма «чувствительного» регулирования уровней восстановленности пар NADH/NAD<sup>+</sup> и убихинол/убихинон. При этом скорость окисления NADH, а следовательно и скорость образования АТФ должна *сильно* зависеть от концентраций таких природных регуляторов. Кроме того, на уровне связывания хинон/хинола для каждого центра может работать и механизм, предложенный Аткинсоном, для регулирования ферментативной активности соотношением продукт/субстрат [12]. Как видно из табл. 2 такой механизм не

работает на уровне нуклеотид-связывающих центров:  $\text{NAD}^+$  вообще не тормозит окисление  $\text{NADH}$ . Может ли активность Комплекса I в митохондриях *in vivo* регулироваться уровнем восстановленности пары убихинол/убихинон по механизму Аткинсона, неизвестно.

#### IV. МЕДЛЕННЫЕ ИЗМЕНЕНИЯ АКТИВНОСТИ КОМПЛЕКСА I

Все, что было сказано в предыдущем разделе о  $\text{NADH}$ :хинон-оксидоредуктазных активностях Комплекса I касается результатов, полученных стандартным способом измерения скоростей ферментативных реакций: регистрация исчезновения субстрата или появления продукта в течение 15–60 секунд после инициирования реакции добавлением фермента или субстрата («начальные» скорости реакции для стационарного состояния, т. е. в условиях, когда концентрации всех возможных форм фермента *не изменяются* во времени). Когда примерно 20 лет тому назад наша группа начала изучение Комплекса I, мы обратили внимание на необычное кинетическое поведение этого фермента при измерениях его активности: «начальные» скорости реакций сильно варьировали для разных препаратов и наблюдалось увеличение активности фермента во времени. Дальнейшее выяснение причин этого простого наблюдения привело нас к представлению о существовании двух медленно взаимопревращающихся форм Комплекса I, свойства которых и условия для их взаимопревращений будут описаны ниже. Уместно отметить, что это явление было «переоткрыто» в нашей лаборатории в 1990 г. [79] и анализ литературы показал, что некоторые, не получившие ясного объяснения экспериментальные результаты, имеющие к нему непосредственное отношение, были опубликованы несколькими независимыми группами задолго до этого. Слейтер в 1950 г. обнаружил, что препарат Кейлина-Хартри (внутренние мембраны митохондрий сердца) катализирует  $\text{NADH}$ :цитохром *c*-редуктазную реакцию с выраженной лаг-фазой [123]. Позднее Моррисон и Кинг показали, что продолжительность лаг-фазы в  $\text{NADH}$ :цитохром *c*-редуктазной реакции сильно увеличивается после тепловой инактивации препарата [93]. Примерно в это же время Минаками и соавт. пришли к заключению, что аномальная кинетика окисления  $\text{NADH}$  связана с реакцией восстановления убихинона [91]. Позднее в лаборатории Лузикова было показано, что после термоинактивации СМЧ приобретают высокую чувствительность к действию протеолитических ферментов (химотрипсин), жирных кислот и фосфолипаз [84, 85]. Термоинактивация  $\text{NADH}$ -оксидазной активности в аэробных условиях обращалась

после добавления к частицам NADH. Лузиков и соавт. предположили, что дыхательные цепи в мембранах митохондрий могут существовать в активной и неактивной формах, а соотношение между ними зависит от скорости переноса электронов [84, 115]. Эстабрук и соавт. сообщили, что NADH-оксидазная активность СМЧ становится чувствительной к NEM после прогревания частиц при 37 °С [92].

Серия работ, выполненных в нашей лаборатории [53, 77–79, 124], позволили обосновать модель, объясняющую «аномальное» поведение Комплекса I в препаратах различной степени сложности. Согласно этой модели, Комплекс I существует в двух *медленно* взаимопревращающихся формах: активной (А) и неактивной (деактивированной) (Д) (рис. 3). А-форма катализирует быструю ротенон-чувствительную NADH:убихинон-редуктазную реакцию (реакция 1). В отсутствие субстратов фермент спонтанно деактивируется (реакция 2) и теряет способность к быстрым реакциям, связанным с окислением и восстановлением убихинона, сохраняя способность катализировать окисление NADH искусственными акцепторами электронов (реакция 3). Процесс деактивации Комплекса I очень сильно зависит от температуры и становится заметным только при температуре > 30 °С. Активационный барьер этого процесса очень высок и составляет 270 кДж/моль, что само по себе указывает на структурные перестройки в комплексе полипептидов, формирующих фермент [79]. Ни NADH в условиях, когда убихинон восстановлен; ни продукты NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции  $\text{NAD}^+$  и убихинол (вместе или по отдельности), ни добавление конкурентного ингибитора ADP-рибозы не влияют на скорость деактивации [3, 79]. К изменению параметров деактивации не приводят ни окисление фермента феррицианидом, ни его восстановление NADH в анаэробных условиях, ни присутствие ионов двухвалентных металлов в среде инкубации [3]. Таким образом, на сегодняшний день воздействие повышенной температуры остается единственным фактором, приводящим к переходу Комплекса I в деактивированное состояние.

ЭПР-спектроскопия Комплекса I в СМЧ показала, что деактивация затрагивает только терминальную убихинон-связывающую область фермента. При добавлении NADH к Д-форме Комплекса I все его железо-серные центры быстро восстанавливаются, однако при этом не обнаруживаются сигналы прочно связанного убисеминина — интермедиата внутримолекулярного переноса электронов на свободный убихинон мембраны [101].

В присутствии субстратов реакции (NADH или NADPH и окисленный убихинон, эндогенный или его водорастворимый гомолог) Д-форма Комплекса I медленно ( $k_a \sim 4 \text{ мин}^{-1}$  при 25 °С) превращается в А-форму (реакция 4) [77]. Процесс активации хорошо заметен при

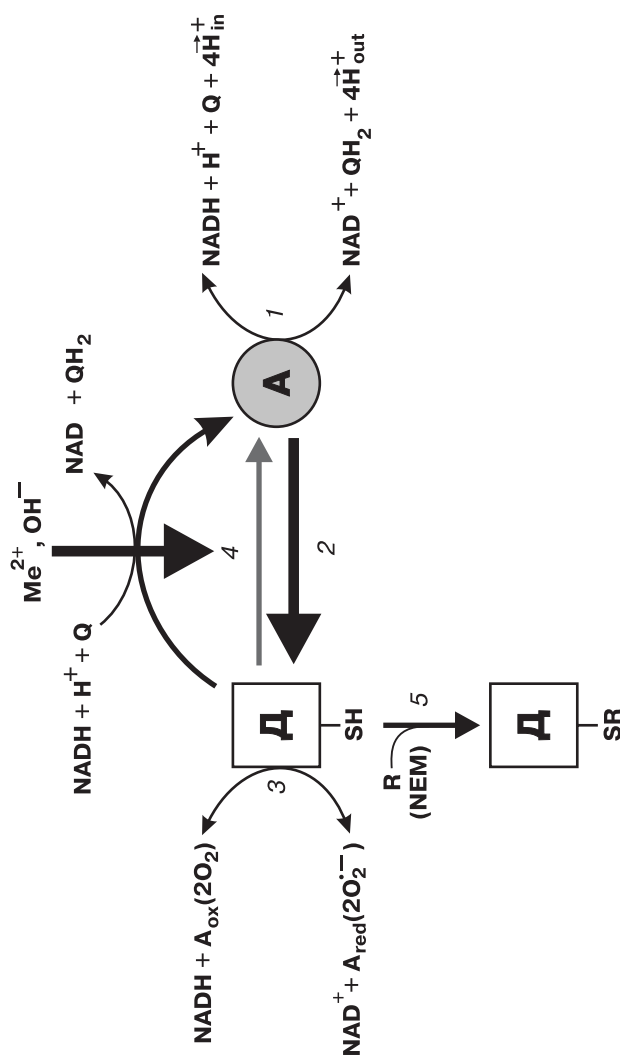


Рис. 3. Медленный  $A \leftrightarrow D$  переход митохондриального Комплекса I.

Активная форма фермента (A) катализирует быструю NADH:убихинон-оксидоредуктазную реакцию, сопровождающуюся переносом четырех протонов из матрикса в межмембранное пространство митохондрий (реакция 1). При высокой температуре ( $> 30^\circ\text{C}$ ) A-форма превращается в D-форму (реакция 2). D-форма не катализирует реакцию 1, но окисляет NADH искусственными акцепторами электронов или молекулярным кислородом (реакция 3). В последнем случае происходит образование супероксид-радикала. Активация D-формы Комплекса I происходит в результате окисления NADH убихиноном (реакция 4). Необратимое алкилирование SH-групп 15 кДа пептида неактивной формы I показано как реакция 5.

регистрации NADH-оксидазной активности предварительно деактивированного Комплекса I: окисление NADH происходит с выраженной лаг-фазой. Для активации фермента необходим один или несколько полных или полу-оборотов: так добавление NADH к деактивированному ферменту в условиях, когда убихинон в мембране полностью восстановлен, например, в присутствии сукцината в анаэробных условиях или в присутствии антимицина или миксотиазола, не приводит к активации фермента [79]. Активация не происходит и при инкубации с  $\text{NAD}^+$  или ADP-рибозой, конкурентными ингибиторами Комплекса I [3]. В то же время фермент полностью превращается в А-форму в аэробных условиях при добавлении к СМЧ субстехиометрических по отношению к содержанию Комплекса I количеств NADH в присутствии NADH-регенерирующей системы [79]. Возможный механизм активации Комплекса I может состоять в медленном образовании прочно связанного убисемихинона после восстановления Д-формы NADH [3]. Каков бы ни был молекулярный механизм «оборот-зависимой» активации, существенный ее аспект состоит в том, что ни восстановление фермента NADH, ни появление восстановленного хинона сами по себе не обеспечивают перехода  $\text{Д} \rightarrow \text{А}$ . Равновесие реакции спонтанного перехода  $\text{А} \leftrightarrow \text{Д}$  сильно смещено в сторону образования Д-формы. Таким образом очевидно, что медленная «затравочная» реакция окисления NADH убихиноном энергетически сопряжена с совершением работы, необходимой для сдвига равновесия  $\text{А} \leftrightarrow \text{Д}$  вправо, против термодинамического потенциала. В «главной» быстрой реакции, катализируемой А-формой, свободная энергия окисления NADH убихиноном используется для возникновения  $\Delta\bar{\mu}_{\text{H}^+}$  (реакция 1). Свободная энергия того же процесса ( $\text{NADH} + \text{Q} + \text{H}^+ \leftrightarrow \text{NAD}^+ + \text{QH}_2$ ) используется в «затравочной» реакции для возникновения термодинамически нестабильной, «напряженной» конформации активного фермента. Интересно отметить, что если все стадии процесса, изображенного на рис. 3, прочно сопряжены, следует ожидать, что продукты прямой реакции ( $\text{NAD}^+$  и убихинол) *должны* «запирать» протекание обратной реакции (обратный перенос электронов), делая фермент неактивным! С другой стороны, не вызывает сомнения, что Комплекс I катализирует обратный перенос электронов, правда со скоростями, составляющими примерно четверть от величин, характерных для прямой реакции, и происходящий другим путем (механизмом) (см. раздел III). Высказанные здесь соображения об энергезависимости катализа и различии путей протекания прямой и обратной реакции, по нашему мнению заслуживают дальнейшего экспериментального развития, так как они касаются достаточно общей проблемы обратимости функ-



ционирования ферментов – энергопреобразователей. Эта проблема применительно к работе другого преобразователя энергии – митохондриальной АТФ-синтетазы подробно обсуждалась в обзорах, недавно опубликованных одним из нас [1, 134].

Скорость активации сильно уменьшается при щелочных значениях рН, в особенности, в присутствии ионов двухвалентных металлов (отметим, что каталитические активности А-формы Комплекса I почти не зависят ни от рН в интервале 7–9, ни от катионов) [77]. Влияние катионов металлов уменьшается в ряду:  $\text{Ni}^{2+} > \text{Co}^{2+} > \text{La}^{3+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Ca}^{2+} \approx \text{Mg}^{2+} > \text{Ba}^{2+}$  [77]. Одновалентные катионы не влияют на скорость реактивации Д-формы Комплекса I [77].

Активная и деактивированная формы фермента различаются не только по своим каталитическим свойствам, но и структурно. Только А-форма связывает с высоким сродством специфические ингибиторы Комплекса I ротенон и пирицидин [59]. Только Д-форма необратимо модифицируется SH-реагентами, что сопровождается ингибированием фермента (реакция 5 на рис. 3) [77]. Методом дифференциального мечения было показано, что одна из субъединиц с молекулярной массой около 15 кДа становится доступной в Д-форме фермента для модификации SH-реагентами [53]. Анализ первичных последовательностей субъединиц с близкими молекулярными массами позволяет предложить два возможных кандидата на роль этой субъединицы: либо 15 кДа субъединицу фрагмента IP (IP-15), либо недавно идентифицированную в составе Комплекса I субъединицу B14.7, гомологичную белкам семейства TIM, принимающим участие в переносе полипептидов, кодируемых ядерным геномом, через внутреннюю мембрану митохондрий [21]. В бактериальных ферментах, у которых  $\text{A} \leftrightarrow \text{D}$  переход отсутствует [76, 60], нет и гомологов субъединиц IP-15 и B14.7. С другой стороны, субъединица IP-15 гомологична одной из субъединиц фермента *N. crassa* (персональное сообщение д-ра А. Видейры, Португалия), а субъединица B14.7 гомологична субъединице 23.4 b кДа Комплекса I *N. crassa* [21].

Практически все препараты Комплекса I представляют собой гетерогенную смесь А- и Д- форм фермента и катализируют окисление NADH с аномальной кинетикой. В связи с этим мы разработали набор методических приемов, позволяющих, с одной стороны, оценивать соотношение активной и деактивированной форм в любом препарате Комплекса I, а с другой стороны – получать препараты, пригодные для стандартного кинетического анализа. Эти приемы, основанные на появлении чувствительности фермента после его деактивации к ионам двухвалентных металлов и к NEM, легко

использовать для обнаружения явления активации/деактивации Комплекса I в различных объектах [58, 60].

Долгое время оставалось неясным, присуще ли явление активации/деактивации интактным митохондриям или оно наблюдается только в препарате СМЧ и изолированном Комплексе I. Нужно иметь в виду, что большая часть Комплекса I в интактных митохондриях экспонирована в матрикс, который содержит множество белков, потенциально способных прямо или косвенно с ним взаимодействовать. При получении частиц, а тем более очищенного Комплекса I применяют достаточно жесткие процедуры, и можно было думать, что само явление  $A \leftrightarrow D$  перехода – артефакт, обусловленный либо модификацией фермента, либо потерей факторов, обеспечивающих стабилизацию активной формы фермента. Изолированные митохондрии – слишком сложный объект для исследования свойств Комплекса I. Связано это прежде всего с тем, что внутренняя мембрана митохондрий непроницаема для пиридиннуклеотидов. Обычно для оценки NADH-оксидазной реакции, катализируемой митохондриями, используют субстраты NAD<sup>+</sup>-зависимых дегидрогеназ, локализованных в митохондриальном матриксе (малат, глутамат, пируват,  $\beta$ -оксибутират и др.). Таким образом, помимо компонентов дыхательной цепи в реакцию окисления NADH кислородом оказываются вовлеченными ферменты-переносчики субстратов и NAD<sup>+</sup>-зависимые дегидрогеназы. Понятно, что кинетический анализ системы, состоящей из такого набора участников, сильно затруднен, если не невозможен. Другая трудность – присутствие в митохондриях эндогенных субстратов-нуклеотидов (NAD<sup>+</sup> и NADP<sup>+</sup>). Для преодоления этих трудностей мы применили каналобразующий антибиотик – аламетицин, который, образуя во внутренней мембране митохондрий поры для низкомолекулярных веществ, обеспечивает ее свободную проницаемость для NADH. Кроме того, использование аламетицина позволяет истощить матрикс митохондрий по никотинамидным коферментам и таким образом предотвратить оборот-зависимую активацию Комплекса I [58]. По данным электронной микроскопии обработка митохондрий аламетицином не приводит к повреждению внешней и внутренней мембран митохондрий [55]. Обработанный аламетицином препарат митохондрий по нашим данным практически полностью сохраняет белки-ферменты матрикса [55].

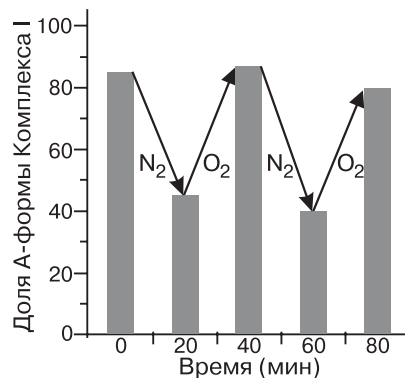
На таком препарате нам удалось показать, что Комплекс I в митохондриях также может существовать в активной и деактивированной форме. Прогревание митохондрий сердца крысы, предварительно обработанных аламетицином, при 37 °С в течение 15 минут приводит к появлению всех «диагностических» признаков деакти-

вации Комплекса I. В NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции появляется отчетливая лаг-фаза, продолжительность которой сильно увеличивается в присутствии  $Mg^{2+}$  и она становится чувствительной к NEM [58]. Процесс деактивации Комплекса I в митохондриях протекает с теми же параметрами, что и в препарате СМЧ [58]. Мы не обнаружили существенного влияния белков матрикса (грубый препарат, полученный осаждением водорастворимых белков супернатанта, остающегося после осаждения СМЧ) на скорости активации и деактивации Комплекса I, однако при добавлении субстратов  $NAD^+$ -зависимых дегидрогеназ белки матрикса полностью защищали Комплекс I от тепловой деактивации [58]. Таким образом, при нормальном снабжении клеток кислородом митохондриальный Комплекс I, по-видимому, всегда находится преимущественно в А-форме. Существуют ли в клетке условия, при которых Комплекс I деактивируется? Ответ на этот вопрос был получен недавно Маклашиной и соавт., которые проследили влияние аноксии и реоксигенации на состояние Комплекса I в митохондриях перфузированного сердца крысы [88]. Оказалось, что в препарате СМЧ, полученных из митохондрий, изолированных из сердца после долгосрочной (60 мин) перфузии средой, насыщенной кислородом, доля А-формы Комплекса I составляет около 90% (рис. 4). При аноксии, когда каталитические обороты фермента становятся невозможными (полное восстановление митохондриального NADH и убихинона), Комплекс I деактивируется и доля его А-формы снижается до 40%. Цикл деактивации (аноксия) – реактивация (аэробная реперфузия) может быть повторен несколько раз (рис. 4). Нам представляется замечательным тот факт, что феномен  $A \leftrightarrow D$  перехода, обнаружение которого было связано с внимательным анализом кинетических кривых регистрации активности, оказался теперь прослеженным в ряду: изолированный очищенный фермент – СМЧ – интактные митохондрии – интактное сердце!

Вопрос о том, является ли процесс активации/деактивации универсальным для эукариотических клеток, оставался открытым. В связи с этим мы проверили возможность аналогичных переходов для Комплекса I в СМЧ гриба *N. crassa*. Выбор этого объекта был обусловлен несколькими причинами. Во-первых, гриб *N. crassa* эволюционно сильно удален от млекопитающих, и в случае обнаружения активации/деактивации у этого объекта предположение о возможной регуляторной роли этого явления было бы сильно подкреплено. Во-вторых, Комплекс I *N. crassa* достаточно хорошо охарактеризован структурно [132], что позволяет провести сравнительный анализ этого фермента с Комплексом I млекопитающих (см. табл. 1). В-третьих, в мембранах

Рис. 4. Влияние аноксии и аэрации в перфузируемом сердце крысы на состояние Комплекса I.

Изолированное сердце крысы попеременно перфузировали средой, насыщенной либо азотом, либо кислородом при 37 °С. В выделенных из перфузированных сердец митохондриях, а затем полученных из них препаратах СМЧ, оценивали долю активной формы Комплекса I, используя в качестве диагностического критерия чувствительность NADH:убихинон-оксидоредуктазной реакции к ионам  $Mg^{2+}$  [88].



митохондрий, выделенных из *N. crassa*, присутствуют по крайней мере еще два фермента, катализирующих окисление NADH: NADH-дегидрогеназа Типа-2 (NDH-2) и  $Ca^{2+}$ -зависимая NADH:убихинон-оксидоредуктаза [131]. Наличие этих ферментов позволяет использовать мутагенез Комплекса I без опасения летальных для организма мутаций. В частности, на этом объекте можно выяснить роль отдельных субъединиц фермента в медленных обратимых взаимопревращениях А- и Д- форм Комплекса I.

Оказалось, что Комплекс I в СМЧ *N. crassa* также существует в виде двух взаимопревращающихся форм, хотя переходы между ними имеют ряд особенностей [60]. Так например, деактивация Комплекса I в *N. crassa* происходит быстрее, чем у Комплекса I сердца млекопитающих (полувремя А → Д превращения  $t_{1/2}$  составляет 5 и 2,5 мин при 25 °С и 30 °С, соответственно, а аналогичные величины для фермента сердца быка равны 100 и 20 мин) [60]. Прослеживается корреляция между температурными условиями функционирования Комплекса I и температурной зависимостью его деактивации. Фермент гриба *N. crassa*, живущего в широком диапазоне температур окружающей среды, деактивируется со значительными скоростями уже при комнатной температуре, тогда как такие же скорости А → Д перехода Комплекса I сердца млекопитающих достигаются только при 37 °С [79]. Это результат указывает на важность этого процесса для природного регулирования каталитической активности Комплекса I. Другая особенность Д-формы Комплекса I *N. crassa* — высокое сродство к ионам двухвалентных металлов: константы диссоциации комплексов Д-формы фермента с ионами  $Mg^{2+}$  равны 0,4 и 0,025 мМ для Комплекса I из сердца быка и *N. crassa* соответственно [60, 77]. В опытах *in vitro* уже при комнатной температуре (20–25 °С) в присутствии  $Mg^{2+}$

полностью активные СМЧ из *N. crassa* катализируют окисление NADH так, как если в стационарном состоянии постоянно происходит циклическое превращение А в Д и обратно (реакции 2 и 4 на рис. 3).

Недавно Маклашина и соавт. опубликовали качественные данные, показывающие, что А ↔ Д переход отсутствует у фермента *E. coli* и некоторых беспозвоночных животных (дождевой червь, сверчок, омар). У позвоночных (каarp, лягушка, цыпленок) Комплекс I существует в виде А- и Д- форм, характеристики перехода между ними близки к таковым для фермента сердца быка. Фермент дрожжей *Y. lipolytica* демонстрирует А ↔ Д переход с существенно меньшим активационным барьером, чем Комплекс I сердца быка [87].

В митохондриях может существовать несколько факторов, влияющих на соотношение А- и Д- форм Комплекса I. К таким факторам можно отнести эндогенные гидрофобные или амфипатические соединения, например, жирные кислоты, которые подобно гидрофобным ингибиторам Q-связывающего центра Комплекса I могут сдвигать равновесие между активной и деактивированной формами фермента в реакции 2 (рис. 3). К факторам, замедляющим активацию фермента (Д → А переход, реакция 4, рис. 3), прежде всего относятся двухвалентные катионы. В матриксе митохондрий обнаруживают ионы  $Mg^{2+}$  в миллимолярных концентрациях, кроме того известно, что митохондрии в различных физиологических условиях способны накапливать значительные количества ионов  $Ca^{2+}$ . Если это происходит в присутствии фосфата, то матрикс митохондрий защелачивается, а это в свою очередь должно дополнительно замедлять скорость активации Комплекса I. При патологических состояниях, например аноксии, Комплекс I переходит в деактивированное состояние [88]. Последующая оксигенация (реперфузия) должна представлять опасность, так как деактивированный Комплекс I очень медленно переходит в активное состояние, а Д-форма фермента способна взаимодействовать с молекулярным кислородом, образуя супероксид-радикал (реакция 3, рис. 3). Было бы интересно (и практически полезно) найти фармакологические препараты, способные влиять на скорости и равновесие А → Д переходов.

## У. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как очевидно из уравнения реакции (1) (см. начало обзора), протон-транслоцирующая NADH:убихинон-оксидоредуктаза в клетках млекопитающих выполняет, по крайней мере, три важнейших функции: 1) фермент обеспечивает главный путь окисления NADH, образующегося в ходе окислительного распада белков, жиров и

углеводов, поддерживая таким образом физиологически необходимое соотношение  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$ ; 2) он служит основным источником электронов для генерации  $\Delta\tilde{\mu}_{\text{H}^+}$  остальными компонентами дыхательной цепи; 3) сам комплекс представляет собой энергопреобразующее устройство, обеспечивающее около трети общего запаса энергии, освобождающейся при окислении  $\text{NADH}$  кислородом.

Сведения, приведенные в этом обзоре, позволяют предполагать, что кроме выше перечисленных Комплекс I выполняет и другие, пока неизвестные функции, иначе непонятно, почему эволюционный отбор привел к возникновению столь сложно организованной структуры, тогда как все три функции вполне успешно (как это происходит у прокариот) реализуются гораздо более простыми образованиями. В одной из последних работ, опубликованной Кембриджской группой (лидирующей в области структурных исследований Комплекса I) авторы подвели итог: Комплекс I митохондрий сердца построен из 46 индивидуальных полипептидов. Таким образом, 32 (!) субъединицы фермента нужны неизвестно для чего. На первый взгляд ситуация похожа на то, что известно (или точнее неизвестно) о специфических функциях многочисленных белков рибосом. Существует, однако, принципиальное различие: белки рибосом, по-видимому, формируют и стабилизируют пространственную структуру главного «каркаса» рибосомы – РНК, тогда как Комплекс I не имеет такого каркаса. Мы полагаем, что одним из важных направлений дальнейших исследований должен стать поиск новых свойств и функций Комплекса I млекопитающих, особенно в сравнении с ферментами прокариот и низших эукариот.

Одна из возможных функций, по крайней мере некоторых субъединиц, – «изоляция» относительно низкопотенциальных редокс-центров от возможных «утечек» электронов на различные акцепторы, в первую очередь, на кислород. Другая функция может состоять в том, что «дополнительные» субъединицы нужны для прецизионного регулирования активности фермента. Последнее утверждение, конечно, останется только декларацией до тех пор, пока для той или иной субъединицы не будет показано ее влияние (прямое или косвенное) на каталитическую активность.

Для биоэнергетики в узком смысле слова основная нерешенная проблема применительно к Комплексу I – механизм электрохимического сопряжения. Принимая во внимание стехиометрию векторного переноса протонов ( $4\text{H}^+$  на  $2\bar{e}$ ) следует считать, что Комплекс I либо содержит две классические Митчелловские петли редокс-реакций, либо фермент работает как редокс-зависимый протонный насос; либо, наконец, реализуется смешанный механизм: насос и петля (как



в цитохромоксидазе). До сих пор многочисленные схемы механизмов, предложенные различными группами, в частности и нашей (векторная дисмутация двух убисемихинонов [133]), остаются только рабочими гипотезами. Многое должно проясниться после установления полной структуры комплекса с достаточно хорошим разрешением.

Другой аспект, открывающий перспективы дальнейших исследований Комплекса I, — биомедицинские проблемы. Мы полагаем, что «главная» функция фермента в тканях млекопитающих — поддержание в клетках стационарного соотношения  $NAD^+/NADH$ . Это утверждение можно обосновать природным примером: митохондрии пекарских дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* вообще не содержат протон-транслоцирующей NADH:хинон-редуктазы, и их аэробная энергетика успешно обеспечивается альтернативными, несопряженными NADH:хинон-редуктазами. Болезни, связанные с повреждениями Комплекса I, генетические или вызванные химическими агентами (отметим, что детергенты, буквально окружающие нас в виде многочисленных моющих средств — специфические и высокоэффективные ингибиторы Комплекса I), по-видимому, можно лечить, искусственно заменяя фермент. Пример элегантной работы такого рода — восстановление способности окислять NADH культуры клеток млекопитающих со специфической мутацией, приводящей к инактивации Комплекса I, генно-инженерным введением в мембрану митохондрий таких клеток дрожжевой NADH:хинон-редуктазы (NADH-дегидрогеназа Типа-2) [148]. Сказанное позволяет считать дальнейшее изучение Комплекса I весьма перспективным направлением биологической химии.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Виноградов А.Д. (1999) Биохимия, **64**, 1443–1456.
2. Виноградов А.Д. (2001) Биохимия, **66**, 1346–1360.
3. Виноградов А.Д., Гаврикова Э.В., Гривенникова В.Г., Жарова Т.В., Захарова Н.В. (1999) Биохимия, **64**, 174–193.
4. Захарова Н.В. (2002) Биохимия, **67**, 785–797.
5. Холден Д.Б.С. Энзимы. 1934 М. Л.: ОНТИ Госхимиздат, 116–119.
6. Ahlers, P.M., Garofano, A., Kerscher, S.J., Brandt, U. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1459**, 258–265.
7. Albracht, S. P. J., Hedderich, R. (2000) FEBS Lett., **485**, 1–6.
8. Albracht, S.P.J., Dooijewaard, G., Leeuwerik, F.J., Van Swol, B. (1977) Biochim. Biophys. Acta, **459**, 300–317.
9. Albracht, S.P.J., Leeuwerik, F.J., Van Swol, B. (1979) FEBS Lett., **104**, 197–200.
10. Allen, R.G., Tresini, M. (2000) Free Radic. Biol. Med., **28**, 463–488.
11. Arizmendi, J.M., Skehel, J.M., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Walker, J.E. (1992) FEBS Lett., **313**, 80–84.
12. Atkinson, D.E. (1970) The Enzymes, **1**, 461–489.



13. Au, H.C., Seo, B.B., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T., Scheffler, I.E. (1999) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 4354–4359.
14. Bakker, P.T.A., Albracht, S.P.J. (1986) Biochim. Biophys. Acta, **850**, 413–422.
15. Beinert, H., Albracht, S.P.J. (1982) Biochim. Biophys. Acta, **683**, 245–277.
16. Beyer, W., Implay, J., Fridovich, I. (1991) Prog. Nucleic. Acid Res. Mol. Biol., **40**, 221–253.
17. Bottcher, B., Scheide, D., Hesterberg, M., Nagel-Steger, L., Friedrich, T. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 17970–17977.
18. Boveris, A., Cadenas, E. (1975) FEBS Lett., **54**, 311–314.
19. Brasseur, G., Bruscella, P., Bonnefoy, V., Lemesle-Meunier, D. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1555**, 37–43.
20. Brody, S., Mikolajczyk, S. (1988) Eur. J. Biochem., **173**, 353–359.
21. Carroll, J., Shannon, R.J., Fearnley, I.M., Walker, J.E., Hirst, J. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 50311–50317.
22. Cecchini, G., Schroder, I., Gunsalus, R.P., Maklashina, E.O. (2002) Biochim. Biophys. Acta, **1553**, 140–157.
23. Chance, B., Hollunger, G. (1960) Nature, **185**, 666–672.
24. Chance, B., Sies, H., Boveris, A. (1979) Physiol. Rev., **59**, 527–605.
25. Chen S., Guillory R. J. (1981) J. Biol. Chem., **256**, 8318–8323.
26. Chevallet, M., Dupuis, A., Lunardi, J., van Belzen, R., Albracht, S.P.J., Issartel, J.P. (1997) Eur. J. Biochem., **250**, 451–458.
27. Chomyn, A., Mariottini, P., Cleeter, M. W. J., Ragan, C. I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, T., Doolittle, R. F., Attardi, G. (1985) Nature, **314**, 592–597.
28. Degli Esposti, M.D. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1364**, 222–235.
29. Deng, P.S.K., Hatefi, Y., Chen, S. (1990) Biochemistry, **29**, 1094–1098.
30. Djafarzadeh, R., Kerscher, S., Zwicker, K., Radermacher, M., Lindahl, M., Schagger, H., Brandt, U., Friedrich, T. (2000) Biochim. Biophys. Acta, **1459**, 230–238.
31. Dooijewaard, G., Slater, E.C. (1976) Biochim. Biophys. Acta, **440**, 1–15.
32. Dooijewaard, G., Slater, E.C. (1976) Biochim. Biophys. Acta, **440**, 16–35.
33. Dupuis, A. (1992) FEBS Lett., **301**, 215–218.
34. Dupuis, A., Chevalet, M., Darrouzet, E., Duborjal, H., Lunardi, J., Issartel, J.P. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1364**, 147–165.
35. Dupuis, A., Peinnequin, A., Chevallet, M., Lunardi, J., Darrouzet, E., Pierard, B., Procaccio, V., Issartel, J.P. (1005) Gene, **167**, 99–104.
36. Dupuis, A., Prieur, I., Lunardi, J. (2001) J. Bioenerg. Biomembr., **33**, 159–168.
37. Dupuis, A., Skehel, J.M., Walker, J.E. (1991) Biochem. J., **277**, 11–15.
38. Earley, F.G.P., Patel, S.D., Ragan, C.I., Attardi, G. (1987) FEBS Lett., **219**, 108–113.
39. Ernster, L., Dallner, G., Azzone, G.F. (1963) J. Biol. Chem., **238**, 1124–1131.
40. Fearnley, I.M., Carroll, J., Shannon, R.J., Runswick, M.J., Walker, J.E., Hirst, J. (2001) J. Biol. Chem., **276**, 38345–38348.
41. Fearnley, I.M., Walker, J.E. (1992) Biochim. Biophys. Acta, **1140**, 105–134.
42. Fecke, W., Sled, V.D., Ohnishi, T., Weiss, H. (1994) Eur. J. Biochem., **220**, 551–558.
43. Finel, M., Majander, A.S., Tyynela, J., de Jong, A.M.P., Albracht, S.P.J., Wikstrom, M. (1994) Eur. J. Biochem., **226**, 237–242.
44. Finel, M., Skehel, J.M., Albracht, S.P.J., Fearnley, I.M., Walker, J.E. (1992) Biochemistry, **31**, 11425–11434.
45. Fisher, N., Rich, P.R. (2000) J. Mol. Biol., **296**, 1153–1162.
46. Frenkin, M.V., Kotlyar, A.B. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1413**, 139–146.
47. Fridovich, I. (1974) Adv. Enzymol., **41**, 35–97.
48. Friedrich, T. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1364**, 134–146.

49. Friedrich, T., Braun, M., Spehr, B., Pohlkotte, B. (1996) *Biochim. Biophys. Acta. EBEC Short Reports*, **9**, 144.
50. Galante, Y., Hatefi, Y. (1979) *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 559–568.
51. Galante, Y., Hatefi, Y. (1978) *Methods Enzymol.*, **53**, 15–21.
52. Gavrikova, E.V., Grivennikova, V.G., Sled, V.D., Ohnishi, T., Vinogradov, A.D. (1995) *Biochim. Biophys. Acta*, **1230**, 23–30.
53. Gavrikova, E.V., Vinogradov, A.D. (1999) *FEBS Lett.*, **455**, 36–40.
54. Gondal, J.A., Anderson, W.M. (1985) *J. Biol. Chem.*, **260**, 12690–12694.
55. Gostimskaya, I.S., Grivennikova, V.G., Zharova, T.V., Bakeeva, L.E., Vinogradov, A.D. (2003) *Analyt. Biochem.*, **313**, 46–52.
56. Graham, L.A., Trumpower, B.L. (1991) *J. Biol. Chem.*, **266**, 22485–22492.
57. Grigorieff, N. (1998) *J. Mol. Biol.*, **277**, 1033–1046.
58. Grivennikova, V.G., Kapustin, A.N., Vinogradov, A.D. (2001) *J. Biol. Chem.*, **276**, 9038–9044.
59. Grivennikova, V.G., Maklashina, E.O., Gavrikova, E.V., Vinogradov, A.D. (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1319**, 223–232.
60. Grivennikova, V.G., Serebryanaya, D.V., Isakova, E.P., Belozerskaya, T.A., Vinogradov, A.D. (2003) *Biochem. J.*, **369**, 619–626.
61. Grivennikova, V.G., Vinogradov, A.D. (2000) *Biochim. Biophys. Acta. EBEC Short Reports*, **11**, 24.
62. Guenebaut, V., Schlitt, A., Weiss, H., Leonard, K.R., Friedrich, T. (1998) *J. Mol. Biol.*, **276**, 105–112.
63. Guenebaut, V., Vincentelli, R., Mills, D., Weiss, H., Leonard, K.R. (1997) *J. Mol. Biol.*, **265**, 409–418.
64. Gutman, M. (1970) *Physiol. Chem. Phys.*, **2**, 9–14.
65. Haldane, J.B.S. (1930) *Enzymes: Longmans, Green And Co. Lond. N.Y. Toronto*, 80–83.
66. Hatefi, Y., Galante, Y.M. (1977) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 846–850.
67. Hatefi, Y., Haavik, A.G., Griffiths, D.E. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 239–245.
68. Hatefi, Y., Hanstein, W.G. (1973) *Biochemistry*, **12**, 3515–3522.
69. Hatefi, Y., Stempel, K.E. (1969) *J. Biol. Chem.*, **244**, 2350–2357.
70. Helfenbaum, L., Ngo, A., Chelli, A., Linnane, A.W., Degli Esposti, M. (1997) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **29**, 71–80.
71. Hensley, K., Robinson, K.A., Gabbita, S.P., Salsman, S., Floyd, R.A. (2000) *Free Radic. Biol. Med.*, **28**, 1456–1462.
72. Hinkle, P.C., Butow, R.A., Racker, E., Chance, B. (1967) *J. Biol. Chem.*, **242**, 5169–5173.
73. Hofhaus, G., Weiss, H., Leonard, K. (1991) *J. Mol. Biol.*, **221**, 1027–1043.
74. Jeng, M., Holl, C., Crane F.L., Takahashi, M., Tamura, S., Folkers, K. (1968) *Biochemistry*, **7**, 1311–1322.
75. Klingenberg, M., Slenczka, W. (1959) *Biochem. Z.*, **331**, 486–517.
76. Kotlyar, A.B., Albracht, S.P.J., van Spanning, R.J.M. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 53–59.
77. Kotlyar, A.B., Sled, V.D., Vinogradov, A.D. (1992) *Biochim. Biophys. Acta*, **1098**, 144–150.
78. Kotlyar, A.B., Sled, V.D., Burbaev, D.Sh., Moroz, I.A., Vinogradov, A.D. (1990) *FEBS Lett.*, **264**, 17–20.
79. Kotlyar, A.B., Vinogradov, A.D. (1990) *Biochim. Biophys. Acta*, **1019**, 151–158.
80. Lawford, H.G., Garland, P.B. (1971) *Biochem. J.*, **130**, 1029–1044.
81. Lee, C.P., Ernster, L. (1967) *Methods Enzymol.*, **10**, 543–548.
82. Lenaz, G. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 53–67.
83. Leonard, K., Haiker, H., Weiss, H. (1987) *J. Mol. Biol.*, **194**, 277–286.
84. Luzikov, V.N., Romashina, L.V. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **267**, 37–47.
85. Luzikov, V.N., Saks, V.A., Berezin, I.V. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 16–30.

86. Magnitsky, S., Touloukhou, L., Yano, T., Sled, V.D., Hagerhall, C., Grivennikova, V.G., Burbaev, D.S., Vinogradov, A.D., Ohnishi, T. (2002) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**, 193–208.
87. Maklashina, E.O., Kotlyar, A.B., Cecchini, G. (2002) *Biochim. Biophys. Acta. EBEC Short Reports*, **12**, 192.
88. Maklashina, E.O., Sher, Y., Zhou, H.-Z., Gray, M.O., Karliner, J.S., Cecchini, G. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 6–12.
89. Massey, V., Strickland, S., Mayhew, S.G., Howell, L.G., Matthews, R.G., Schuman, M., Sulliwass, P.A. (1969) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **36**, 891–897.
90. Masui, R., Wakabayash, S., Matsubara, H., Hatefi, Y. (1991) *J. Biochem.*, **109**, 534–543.
91. Minakami, S., Schindler, F.J., Estabrook, R.W. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2049–2054.
92. Minakami, S., Schindler, F.J., Estabrook, R.W. (1964) *J. Biol. Chem.*, **239**, 2042–2048.
93. Morrison, R.O., King, T.E. (1962) *Biochemistry*, **1**, 1017–1024.
94. Nakamaru-Ogiso, E., Sakamoto, K., Matsuno-Yagi, A., Miyoshi, H., Yagi, T. (2002) *Biochim. Biophys. Acta. EBEC Short Reports*, **12**, 206.
95. Nohl, H., Hegner, D. (1978) *Eur. J. Biochem.*, **82**, 563–567.
96. Ohnishi, T. (1975) *Biochim. Biophys. Acta*, **387**, 475–490.
97. Ohnishi, T. (1979) *Membrane Proteins in Energy Transduction.* / Ed. R.A. Capaldi. New York: Dekker, 1–87.
98. Ohnishi, T. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 186–206.
99. Ohnishi, T., Blum, H., Galante, Y.M., Hatefi, Y. (1981) *J. Biol. Chem.*, **256**, 9216–9220.
100. Ohnishi, T., Salerno, J.C. (1982) *Iron-sulfur proteins.* / Ed. T. Spiro. Vol. IV. N.Y.: Wiley Publishing Co. Inc., 285–327.
101. Ohnishi, T., Sled, V.D., Yano, T., Yagi, T., Burbaev, D.S., Vinogradov, A.D. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 301–308.
102. Okun, J.G., Zickermann, V., Zwicker, K., Schagger, H., Brandt, U. (2000) *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 77–87.
103. Papa, S. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 147–153.
104. Prieur, I., Lunardi, J., Dupuis, A. (2001) *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 173–178.
105. Ragan, C.I., Galante, Y.M., Hatefi, Y. (1982) *Biochemistry*, **21**, 2518–2524.
106. Ragan, C.I., Hinkle, P.C. (1975) *J. Biol. Chem.*, **250**, 8472–8480.
107. Ragan, C.I., Racker, E. (1973) *J. Biol. Chem.*, **248**, 2563–2569.
108. Ragan, C.I., Widger, W.R., King, T.E. (1974) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **3**, 894–900.
109. Rao, N.A., Felton, S.P., Huennekens, F.M., Mackler, B. (1963) *J. Biol. Chem.*, **238**, 449–455.
110. Rasmusson, A.G., Heiser, V., Zabalata, E., Brennicke, A., Grohmann, L. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 101–111.
111. Rutherford, K.J., Chen, S., Shively, J.E. (1991) *Biochemistry*, **30**, 8108–8116.
112. Ruzicka, F.J., Crane, F.L. (1970) *Biochim. Biophys. Acta*, **223**, 71–85.
113. Sackmann, U., Zensen, R., Rohlen, D., Jahnke, U., Weiss, H. (1991) *Eur. J. Biochem.*, **200**, 463–469.
114. Salerno, J.C., Ohnishi, T., Lim, J., Widger, R., King, T.E. (1977) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **75**, 618–624.
115. Saks, V.A., Kupriyanov, V.V., Luzikov, V.N. (1972) *Biochim. Biophys. Acta*, **283**, 42–53.
116. Sastre, J., Pallardo, F.V., Vina, J. (2000) *IUBMB Life*, **49**, 427–435.
117. Sazanov, L.A., Peak-Chew, S.Y., Fearnley, I.M., Walker, J.E. (2000) *Biochemistry*, **39**, 7229–7235.
118. Schapira, A.H.V. (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 261–270.
119. Schatz, G., Racker, E. (1966) *J. Biol. Chem.*, **241**, 1429–1437.

120. *Schneider, R., Massow, M., Lisowsky, T., Weiss, H.* (1995) *Curr. Genet.*, **29**, 10–17.
121. *Schuler, F., Yano, T., Di Bernardo, S., Yagi, T., Yankovskaya, V., Singer, T.P., Casida, J.E.* (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 4149–4153.
122. *Skehel, J.M., Fearnley, I.M., Walker, J.E.* (1998) *FEBS Lett.*, **438**, 301–305.
123. *Slater, E.C.* (1950) *Biochem. J.*, **46**, 499–503.
124. *Sled, V.D., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H., Meinhardt, S.W., Fukumori, Y., Galhoun, M., Gennis, R.B., Ohnishi, T.* (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 347–356.
125. *Sled, V.D., Rudnitzky, N.I., Hatefi, Y., Ohnishi, T.* (1994) *Biochemistry*, **33**, 10069–10075.
126. *Sled, V.D., Vinogradov, A.D.* (1993) *Biochim. Biophys. Acta*, **1141**, 262–268.
127. *Sumegi, B., Srere, P.A.* (1984) *J. Biol. Chem.*, **259**, 15040–15045.
128. *Tuschen, G., Sackmann, U., Nehls, U., Haiker, H., Buse, G., Weiss, H.* (1990) *J. Mol. Biol.*, **213**, 845–857.
129. *Ursini, F., Maiorino, M., Brigelius-Flohe, R., Aurnann, K.D., Roveri, A., Schomburg, D., Flohe, L.* (1995) *Methods Enzymol.*, **252**, 38–53.
130. *Ushakova, A.V., Grivennikova, V.G., Ohnishi, T., Vinogradov, A.D.* (1999) *Biochim. Biophys. Acta*, **1409**, 143–153.
131. *Videira, A., Duarte, M.* (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 187–191.
132. *Videira, A., Duarte, M.* (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 197–203.
133. *Vinogradov, A.D.* (1993) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 367–375.
134. *Vinogradov, A.D.* (2000) *J. Exp. Biol.*, **203**, 41–49.
135. *Vinogradov, A.D., Sled, V.D., Burbakov, D.Sh., Grivennikova, V.G., Moroz, I.A., Ohnishi, T.* (1995) *FEBS Lett.*, **370**, 83–87.
136. *Walker, J.E.* (1992) *Q. Rev. Biophys.*, **25**, 253–324.
137. *Walker, J.E., Arizmendi, J.M., Dupuis, A., Fearnley, I.M., Finel, M., Medd, S.M., Pilkington, S.J., Runswick, M.J., Skehel, J.M.* (1992) *J. Mol. Biol.*, **226**, 1051–1072.
138. *Wan, Y.-P., Williams, R.H., Folker, K., Leung, K.H., Racker, E.* (1975) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **63**, 11–15.
139. *Wang, D.C., Meinhardt, S.W., Sackmann, U., Weiss, H., Ohnishi, T.* (1991) *Eur. J. Biochem.*, **197**, 257–264.
140. *Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H.* (1993) *J. Mol. Biol.*, **233**, 109–122.
141. *Weiss, H., Friedrich, T., Hoffhaus, G., Preis, D.* (1991) *Eur. J. Biochem.*, **197**, 563–576.
142. *Xu, X., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T.* (1991) *Biochemistry*, **30**, 6422–6428.
143. *Xu, X., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T.* (1991) *Biochemistry*, **30**, 8648–8684.
144. *Xu, X., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T.* (1992) *Arch. Biochem. Biophys.*, **296**, 40–48.
145. *Xu, X., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T.* (1992) *Biochemistry*, **31**, 6925–6932.
146. *Xu, X., Matsuno-Yagi, A., Yagi, T.* (1993) *Biochemistry*, **32**, 968–981.
147. *Yagi, T., Dinh, T.M.* (1990) *Biochemistry*, **29**, 5515–5520.
148. *Yagi, T., Seo, B.-B., Di Bernardo, S., Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M.-C., Matsuno-Yagi, A.* (2001) *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 233–241.
149. *Yagi, T., Yano, T., Di Bernardo, S., Matsuno-Yagi, A.* (1998) *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 125–133.
150. *Yamaguchi, M., Belogradov, G.I., Matsuno-Yagi, A., Hatefi, Y.* (2000) *Eur. J. Biochem.*, **267**, 329–336.
151. *Yano, T., Chu, S.S., Sled, V.D., Ohnishi, T., Yagi, T.* (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 4201–4211.
152. *Zakharova, N.V., Zharova, T.V., Vinogradov, A.D.* (1999) *FEBS Lett.*, **444**, 211–216.
153. *Zharova, T.V., Vinogradov, A.D.* (1997) *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 256–264.