УДК 577.151.63

ОСОБЕННОСТИ УСТРОЙСТВА И МЕХАНИЗМА КАТАЛИЗА ДВУХ СЕМЕЙСТВ ТЕРМИНАЛЬНЫХ ОКСИДАЗ: ГЕМ-МЕДНЫХ И *bd*-ТИПА

Обзор

© 2019 В.Б. Борисов^{*,**}, С.А. Силецкий

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

> Поступила в редакцию 03.06.2019 После доработки 09.07.2019 Принята к публикации 10.07.2019

Терминальные оксидазы аэробных дыхательных цепей организмов катализируют перенос электронов с дыхательного субстрата, цитохрома *с* или хинола, на O_2 с образованием $2H_2O$. Известно два семейства этих оксидоредуктаз, интегрированных в мембрану: семейство гем-медных оксидаз и семейство оксидаз типа *bd* (цитохромов *bd*), найденных только у прокариот. Катализируемая этими ферментами окислительно-восстановительная реакция сопряжена с генерацией протон-движущей силы, которая используется клеткой для синтеза ATФ и совершения иной полезной работы. Благодаря наличию протонного насоса гем-медные оксидазы создают мембранный потенциал с большей энергетической эффективностью, чем цитохромы *bd*. Последние, однако, играют важную физиологическую роль, позволяя бактериям, в том числе патогенным, выживать и размножаться в неблагоприятных условиях окружающей среды. В обзоре рассматриваются особенности устройства и молекулярных механизмов функционирования терминальных окидаз из этих двух семейств в свете полученных за последнее время экспериментальных данных.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, цитохромоксидаза, цитохром *bd*, гем, каталитический цикл, кислородные интермедиаты, мембранный потенциал, протонный насос. **DOI:** 10.1134/S0320972519110137

Кислород-зависимая дыхательная цепь переноса электронов митохондрий животных представлена мембранно-связанными ферменокислительного фосфорилирования: тами NADH:хинон-оксидоредуктазой, *bc*₁-комплексом и терминальной оксидазой. Эти белковые комплексы играют центральную роль в энергетическом метаболизме клетки. На каждом из этих пунктов сопряжения запасается энергия в виде протон-движущей силы, которая затем утилизируется ATP-синтазой F₀ F₁ дыхательной цепи для синтеза АТР. В отличие от митохондрий животных дыхательные цепи бактерий обычно имеют разветвленный характер. Их начальный и конечный участок может быть представлен более чем одним ферментом, а присутствие bc_1 -комплекса необязательно. Терминальные оксидазы катализируют восстановление молекулярного кислорода до воды дыхательным субстратом: цитохромом *с* или хинолом. Ферменты делят на три основные группы: суперсемейство гем/Си-содержащих оксидаз, семейство хинолоксидаз типа *bd* и семейство альтернативных оксидаз (рис. 1). Последние в этом обзоре не рассматриваются.

ГЕМ-МЕДНЫЕ ТЕРМИНАЛЬНЫЕ ОКСИДАЗЫ

К суперсемейству гем-медных оксидаз (ГМО) принадлежат цитохромоксидазы (ЦО) митохондрий высших и низших эукариот, ГМО большинства аэробных прокариот, а также структурно-родственные NO-редуктазы [1]. Отличительной особенностью ферментов суперсемейства является наличие каталитического биядерного центра (BNC), который состоит из иона железа гемовой группы (в NO-редуктазах – иона негемового железа) и иона меди, близко расположенных.

Принятые сокращения: ГМО – гем-медная оксидаза; ЦО – цитохромоксидаза; ВNС – биядерный центр; PLS – протон-загрузочный сайт.

^{*} Адресат для корреспонденции.

^{**} Автор является выпускником кафедры биохимии биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

ГМО катализируют перенос электронов от хинолов или цитохромов на кислород с образованием воды сопряженно с генерацией протондвижущей силы [2]. В отличие от оксидаз типа *bd* ГМО образуют протон-движущую силу как за счет переноса электронов и протонов в каталитический центр с разных сторон мембраны, так и благодаря уникальной способности к редокс-сопряженному направленному перекачиванию протонов через мембрану [3]. Структурно сходные с ГМО NO-редуктазы восстанавливают NO в N₂O и используются рядом патогенных бактерий в ходе денитрификации в микро- и анаэробных условиях, реализующихся во многих тканях хозяина [4].

Цитохромоксидаза митохондрий млекопитающих содержит 13 субъединиц, из которых три наибольшие субъединицы кодируются митохондриальным геномом. Они образуют каталитическое ядро фермента (рис. 2) и гомологичны трем основным субъединицам, встречающимся в большинстве типичных прокариотических цитохромоксидаз семейства А. В первой субъединице расположены 3 редокс-центра: низкоспиновый гем а и биядерный кислородредуктазный каталитический центр (BNC), состоящий из близкорасположенных иона железа высокоспинового гема a_3 и иона меди (Cu_B) (рис. 2). В прокариотических ГМО гемы a и a_3 могут заменяться гемами b-, o- и c-типа. Гемы cтипа могут служить также в качестве дополнительных редокс-центров, к примеру, в саа₃ или *cbb*₃ оксидазах.

Важнейшим признаком, позволяющим систематизировать ГМО и NO-редуктазы, является устройство внутрибелковых протон-проводящих путей («каналов»), которые соединяют каталитический центр с цитоплазматической стороной мембраны, обеспечивая проведение субстратных протонов, необходимых для образования воды, а также протонов, перекачиваемых через мембрану. Используя различие в строениях этих путей, среди ГМО выделяют семейства А, В и С [5] (рис. 1).

В результате использования рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная кристаллическая структура типичных представителей семейства А ГМО с разрешением, достигающим в ряде случаев 1,8 Å. Это ЦО из митохондрий сердечной мышцы быка [6], бактериальные ЦО *аа*₃-типа из *Paracoccus denitrificans* [7] и *Rhodobacter sphaeroides* [8] и хинолоксидаза *bo*₃ из *Escherichia coli* [9]. Несмотря на высокое разрешение, природа лиганда активного центра в закристаллизованном ферменте (перекись, супероксид, ион хлора или гидроксил-анион) до сих пор остается предметом дискуссий. В ряде случа-



Рис. 1. Терминальные оксидазы аэробных дыхательных цепей организмов. Ферменты включают в свой состав суперсемейство гем-медных оксидаз, семейство оксидаз типа bd (цитохромов bd), а также семейство альтернативных оксидаз. В зависимости от особенностей строения внутрибелковых протон-проводящих путей, гем-медные оксидазы подразделяются на семейства А, В и С. Цитохромы bd делятся на подсемейства L и S на основании размера «Q-петли». Альтернативные оксидазы, которые в этом обзоре не рассматриваются, не являются интегральными мембранными ферментами и не генерируют протон-движущую силу

ев разрешены структуры восстановленной формы фермента, комплекса фермента с CO и N_3^- , одной из мутантных форм по ключевому остатку E286Q, а также дыхательного суперкомплекса «респирасомы», в который объединены отдельные комплексы дыхательной цепи митоходрий, включая первый, третий и четвертый (другое название ЦО) в стехиометрии CI(CIII)₂C(IV) [10]. В то же время с помощью двумерной электронной кристаллографии показано, что мономерная форма ЦО млекопитающих функционально активна и не является артефактом выделения фермента из мембраны митохондрий. Несмотря на выяснение общей топографии, детальная картина элементарных процессов превращения атомов кислорода в BNC и сопряженного переноса зарядов на молекулярном уровне только начинает вырисовываться [11, 12].

Характерным признаком ЦО семейства А является наличие двух протон-проводящих путей (D- и К-каналы) в мембране, начинающихся со стороны цитоплазмы и имеющих высококонсервативные протон-обменивающие группы [13]. Согласно полученным данным [13, 14], через эти пути происходит сопряженный перенос протонов со стороны цитоплазмы через мембрану в каталитический центр (т.н. субстратные протоны или протоны субстрата) и в периплазматическое пространство (т.н. перекачиваемые»протоны или протоны, переносимые через мембрану) (рис. 2). Исходя из модели, сформулированной в ходе исследований *аа*₃ оксидаз из



Рис. 2. Схема устройства цитохромоксидазы. Показаны 3 главные субъединицы: субъединица I, несущая 3 редоксцентра: гемы a, a_3 и медь Cu_B, субъединица II, несущая 4-й редокс-центр Cu_A, и субъединица III. Показаны два внутрибелковых протон-проводящих пути: D- и К-каналы. Оба пути ведут из отрицательно заряженной цитоплазматической стороны мембраны в направлении к каталитическому биядерному центру (BNC). Показан выходной протон-проводящий путь.

С цветным вариантом рис. 2 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

P. denitrificans и *R. sphaeroides*, К-канал служит для проведения части субстратных протонов в каталитическом цикле, тогда как перекачиваемые через мембрану протоны и оставшиеся субстратные протоны переносятся через D-канал (рис. 3).

Каталитический цикл цитохромоксидазы состоит из двух полуреакций (восстановительной и окислительной), каждая из которых включает в себя два одноэлектронных перехода. Восстановительная фаза в только что окисленном «неотрелаксированном» ферменте включает в себя последовательный перенос двух электронов через входные редокс-центры в каталитический центр на гем a_3 и Си_в (переходы О_H \rightarrow E_H и E_H \rightarrow R соответственно, рис. 3). В результате BNC восстанавливается из полностью окисленного состояния О_H в восстановленное состояние (R) и приобретает способность связывать молекулярный кислород (ссылки в статье Siletsky [2]).

Окислительная фаза начинается связыванием молекулы кислорода с центральным ионом железа высокоспинового гема a_3 восстановленного биядерного центра. В результате образуется первичный двухатомный кислородный аддукт (состояние A, не показано на рис. 3), представляющий собой смесь состояний: Fe²⁺-O₂ и Fe³⁺-O₂. На следующей стадии разрывается O–O связь и образуется соединение P (рис. 3), для чего из активного центра на молекулу O_2 одновременно поступают четыре электрона и протон. Три электрона приходят в результате окисления иона Fe²⁺ гема a_3 до оксоферрильного состояния Fe⁴⁺=O²⁻ и Cu⁺_B, окисляющийся до Cu²⁺_B. Четвертый электрон и протон поступают от близко расположенного консервативного остатка тирозина Y288, образующего в ходе посттрансляционной модификации ковалентную связь с одним из гистидиновых лигандов Cu_B (ссылки в статье Siletsky [2]).

Две электронные вакансии, возникшие в каталитическом центре ЦО, заполняются в ходе переноса от цитохрома с 3-го и 4-го электронов. Перенос 3-го электрона от цитохрома с на остаток тирозина Y288 приводит к образованию в каталитическом цикле ЦО состояния F биядерного центра (рис. 3). Перенос 4-го электрона от цитохрома c на гем a_3 восстанавливает оксоферрильное состояние гема a_3 в окисленное состояние О_н. В отсутствие доноров электронов окисленное «неотрелаксированное» состояние О_Н в секундной временной шкале спонтанно превращается в окисленное стабильное состояние О. Состояния О и О_н отличаются между собой сродством к электрону соответствующих редокс-центров фермента, а также способностью трансмембранной перекачке протонов Κ [15-20]. Вопрос о структурных отличиях между этими двумя состояниями остается открытым и, как полагают, может быть связан с лигандной сферой Си_в [21].

С помощью специфической обработки перекисью водорода или окисью углерода цитохромоксидаза может быть зафиксирована в ряде состояний BNC, соответствующих частичному восстановлению кислорода (F и/или P). Используя прямой электрометрический метод, традиционно применяемый для исследования стадий переноса зарядов в светозависимых белках-генераторах $\Delta \mu_{H}^{+}$ [22–25], эти подходы позволяют изучать с временным разрешением отдельные одноэлектронные стадии каталитического цикла цитохромоксидазы в ответ на введение электрона от фотоактивируемого комплекса рутения (перенос в каталитическом цикле 1-го [15, 17-20, 26, 27], 3-го [15, 28, 29] и 4-го [13, 14, 30–32] электронов соответственно).

В экспериментах с микросекундным временным разрешением были получены прямые указания на то, что каждый из 4-х одноэлектронных переходов в каталитическом цикле ЦО семейства А сопряжен с перекачиванием одного протона через мембрану [14, 15, 33, 34]. Так, при введении электрона в состояние F (переход F→O_H) цитохромоксидазы семейства А были разрешены 3 основные компоненты генерации мембранно-

го потенциала [26]. «Быстрая» микросекундная фаза отражала перенос электрона от Cu_A к гему *a*, в то время как «средняя» и «медленная» миллисекундные фазы — электрогенный перенос протонов, сопряженный с переносом электрона от гема *a* в BNC. Исходя из сравнения с амплитудой электрогенного переноса электрона от Cu_A к гему *a*, удалось прямо оценить валовый перенос протонов в электрогенных протонных фазах, как перенос одного протона через всю диэлектрическую толщину мембраны и перенос одного субстратного протона из внутренней водной фазы в BNC (рис. 3) [14, 32].

Электрогенные фазы значительно отличаются между собой эффектом изотопного замещения, что позволило идентифицировать их аналоги при исследовании мутантных форм и соотнести их с переносом протонов разного типа [14]. «Средняя» фаза отсутствовала в несопряженном мутанте с заменой в D-канале (N139D), сохраняющем кислород-редуктазную активность без перекачивания протонов через мембрану. Это указывает на связь «средней» фазы с переносом перекачиваемого протона и на то, что перекачиваемый протон перемещается раньше субстратного [14]. Соответственно, «медленная» фаза сохранялась в мутанте и была интерпретирована как перенос субстратного протона в BNC [14]. «Медленная» фаза замедлялась в присутствии ионов цинка (ингибитора протонного транспорта), добавленных снаружи к протеолипосомам с ЦО [31], что указывает на вклад в «медленную» фазу высвобождения перекачиваемого протона на внешнюю сторону мембраны. При использовании мутации N139L, перекрывающей вход в D-канал, была выявлена электрогенная стадия переноса протона от внутреннего донора E286 в верхней части D-канала в каталитический центр BNC и установлено электрогенное расстояние между ними [32].

Согласно имеющимся данным, была сформулирована схема организации перекачки протона в ходе одноэлектронного перехода $F \rightarrow O$ в прокариотических ГМО семейства A [19]. Транслокация протонов начинается с переноса перекачиваемого протона от остатка E286 в «ловушку», так называемый протон-загрузочный сайт (PLS), расположенный выше BNC (рис. 2). Субстратный протон переносится также от остатка E286 непосредственно в BNC. При этом E286 репротонируется 2× через D-канал. Перенос электрона от гема *а* в BNC и репротонирование E286 приводят к тому, что перекачиваемый протон высвобождается из PLS на внешнюю сторону мембраны (рис. 2).

Несмотря на относительную простоту предлагаемой модели, ключевые проблемы молеку-

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

лярного механизма сопряженного перекачивания протонов в прокариотических ГМО семейства А остаются нерешенными. Точная локализация PLS неизвестна. Согласно одним представлениям, в качестве PLS рассматривается Апропионат гема a_3 и/или один из гистидиновых лигандов Cu_B [35]. Согласно другим, PLS может быть локализован в гидрофильном домене, расположенном над гемами, ближе к гему а [36], либо роль PLS может выполняться кластером протон-обменивающих групп, включающим пропионаты A и D гема a_3 и расположенные вблизи остатки (D52 и K171, как в случае ЦО митохондрий) [37]. Наконец, высказано предположение о том, что в качестве PLS может служить расположенный над BNC редокс-активный остаток триптофана [38].

Неизвестно, каким образом обеспечивается направленный перенос перекачиваемого протона от внутреннего донора протонов E286 к PLS и субстратного протона к BNC, а также, каким образом перекачиваемый протон избегает участия в каталитической химии формирования молекул воды. Можно выделить два принципиально отличающихся гипотетических механизма. Согласно первой модели, направленный перенос перекачиваемого и субстратного протонов от E286 к PLS и от E286 к BNC соответственно может обеспечиваться посредством модулирова-



Рис. 3. Каталитический цикл цитохромоксидазы. Соединения в квадратах, нарисованных сплошными линиями ($\mathbf{P}, \mathbf{F}, \mathbf{O}_{H}, \mathbf{E}_{H}, \mathbf{R}$), – каталитические интермедиаты фермента. Структура соединений обсуждается в тексте обзора. Протоны, транспортируемые через D- и K-каналы, обозначены соответствующими индексами

ния ориентации цепочек воды редокс-состоянием гема *a* и BNC, без заметных изменений конформации ЦО [12]. Согласно другой модели, ключевое значение могут играть конформационные изменения в области остатка E286 и/или PLS, которые приводят к периодическим изменениям сродства к протону и контакта данной(ых) групп(ы) с входным и выходным протон-транслоцирующим путем [39].

Как было сказано выше, ЦО митохондрий содержат в дополнение к 3-м главным субъединицам большое количество дополнительных субъединиц (до 10), кодируемых ядерным геномом. Набор этих субъединиц характеризуется видо- и тканеспецифичностью, что приводит к особенностям физиологической регуляции их каталитической активности [40].

В то же время, несмотря на сходство архитектуры трех главных субъединиц оксидазы митохондрий с бактериальными ферментами, были выявлены значительные отличия в кинетических свойствах генерации мембранного потенциала гем-медных оксидаз внутри семейства А (прокариотических и эукариотических), что указывает на то, что электрогенный механизм трансформации энергии и перекачивания протонов не является универсальным [2, 41, 42].

Если в прокариотических оксидазах ключевая роль в «рабочем» электрогенном механизме протонного насоса отводится сопряжению переноса перекачиваемого протона с восстановлением BNC гемом *a*, то молекулярный механизм перекачки протонов в митохондриальном ферменте предполагает важную роль редокс-превращений собственно гема а и конформационных изменений вблизи гема a, то есть на значительном удалении от BNC. Исходя из данных рентгено-структурного анализа, было высказано предположение о том, что в эукариотических ЦО перенос перекачиваемых протонов через мембрану в ходе каталитического цикла может происходить с использованием дополнительного протон-проводящего пути – Н-канала, проходящего вблизи гема а [11, 36].

Функция этого канала и регуляция проведения по нему протонов, включая физиологические аспекты этой регуляции, изучена мало. Согласно одной из гипотез, Н-канал участвует в проведении перекачиваемого протона через всю мембрану [11]; согласно другой — используется только верхняя часть этого пути [36]. Наконец, согласно третьей гипотезе, Н-канал не выполняет функцию перекачивания протонов вообще, а является т.н. диэлектрическим «колодцем», роль которого может заключаться в модуляции редокс-потенциала близлежащего переносчика электронов гема *a* [43, 44].

Гем-медные оксидазы семейств В и С встречаются только в прокариотах, они близки между собой филогенетически и сходны друг с другом и NO-редуктазами по первичной последовательности и целому ряду структурно-функциональных особенностей, в то же время значительно отличаясь от оксидаз семейства А. Нужно отметить их важное биомедицинское значение. Так, значительное число патогенных микроорганизмов использует в качестве ЦО представителей семейства С (cbb₃ оксидазы). Среди них возбудители таких болезней, как нозокомиальные инфекции (Pseudomonas aeruginosa), гонорея (Neisseria gonorrhoeae), менингококковая инфекция (Neisseria meningitidis), гастроэнтериты (Campylobacter jejuni) и др. Есть также целый ряд патогенов, экспрессирующих в качестве единственной терминальной оксидазы ферменты из семейства С, среди которых такие важные, как, например, *Helicobacter pylori*.

Изучение оксидаз семейств В и С начато относительно недавно и активно развивается в последние годы [20, 45]. В отличие от оксидаз семейства А стехиометрия перекачивания протонов в ЦО семейств В и С может варьировать в значительных пределах от 0,5 протона на электрон, поступающий в BNC, до ~0,85 [27, 42, 45–48].

Исходя из первичной последовательности, в ЦО семейств В и С, по-видимому, функционирует лишь один входной протонный канал, гомологичный К-каналу оксидаз семейства А [1]. При этом представители обоих семейств способны переносить как субстратные протоны с цитоплазматической стороны мембраны в BNC, так и перекачивать протоны через мембрану. Молекулярный механизм перекачивания протонов в этих ферментах мало изучен и, по-видимому, значительно отличается от такового для представителей канонического семейства А.

В случае ЦО ba_3 из Thermus thermophilus, типичного представителя семейства В, были разрешены стадии электрогенного переноса протонов в окислительной фазе каталитического цикла [46] и в первом переходе восстановительной части каталитического цикла [20]. Были выявлены стадии, перенос электрона в которых не сопряжен с перекачиванием протона через мембрану, что объясняет снижение эффективной стехиометрии перекачки протонов в оксидазах семейства В [20, 46]. В частности, было показано, что в отличие от оксидаз семейства А в окислительной фазе каталитического цикла ЦО ba₃ из T. thermophilus происходит перекачивание одного протона через мембрану вместо двух [46]. В то же время перенос 1-го электрона в восстановительной части каталитического цикла (переход $O_H \rightarrow E_H$) также не сопряжен с перекачиванием

протонов через мембрану, что может быть следствием влияния формирующегося мембранного потенциала [20].

Выяснение молекулярного механизма сопряженного перекачивания протонов в ЦО разных типов остается одной из наиболее значимых задач биоэнергетики, учитывая уникальность редокс-сопряженного протонного насоса ЦО и необходимость создания искусственных наномолекулярных устройств, имитирующих природные молекулярные машины.

Представители семейств В и С имеют существенные отличия в редокс-свойствах и во взаимодействии биядерного центра с внешними лигандами от ЦО семейства А [27, 49]. Оксидазы семейств В и С имеют большее сродство к кислороду, что дает возможность колонизировать микроаэробные ткани организма хозяина. Каталитический центр этих ферментов отличается также способностью восстанавливать NO в N₂O [50], что, по-видимому, способствует, как и в случае bd оксидаз и NO-редуктаз, сопротивлению патогенных представителей семейства С токсическому действию NO, вырабатываемому макрофагами хозяина (другими словами, нитрозильному стрессу), и обусловливает важность их исследования в будущем с точки зрения потенциальных биомедицинских приложений.

ТЕРМИНАЛЬНЫЕ ОКСИДАЗЫ ТИПА bd

Наряду с многообразными представителями суперсемейства ГМО в терминальном участке дыхательных цепей бактерий и архей широко представлены оксидазы типа bd (цитохромы bd) [42, 51]. Цитохромы bd в отличие от ГМО в дыхательных цепях эукариот не находят [52]. Выравнивание аминокислотных последовательностей оксидаз типа bd и ГМО свидетельствует об отсутствии гомологии между ними [53]. Не обнаруживается и сходства третичной структуры разных представителей ГМО с первой опубликованной трехмерной структурой цитохрома bd из бактерии Geobacillus thermodenitrificans К1041 [54]. Интересно, однако, отметить, что, несмотря на отсутствие гомологии с ЦО, цитохром bd-I E. coli способен прочно связываться с мембраной митохондрий сердца быка и выступать в качестве функционального компонента химерной дыхательной цепи с заингибированным *bc*₁-комплексом, восстанавливая NADHоксидазную и сукцинат-оксидазную активности [55]. В отличие от ГМО оксидазы типа bd не содержат в своем составе иона меди; по этой причине гем-медный BNC у них тоже отсутствует. Несходство bd ферментов и ГМО также и в том,

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

что первые не могут использовать цитохром с в качестве донора электронов: все известные на сегодняшний день оксидазы типа bd – хинолоксидазы. bd ферменты могут окислять убихинол, менахинол либо даже пластохинол [42]. Еще одно важное отличие цитохрома bd от ГМО заключается в том, что он генерирует протон-движущую силу исключительно за счет векторного перемещения субстратных протонов по внутрибелковому протон-проводящему пути без задействования механизма трансмембранного протонного насоса [56-61]. Отсутствие протонного насоса скорее всего является причиной того, что у оксидаз типа bd стехиометрия протон/электрон равна 1, что в полтора-два раза ниже, чем у ГМО [61].

Основная роль канонических ГМО семейства А состоит в обеспечении клетки энергией, необходимой для синтеза АТР в окислительном фосфорилировании, тогда как главная физиологическая функция цитохрома bd, по-видимому, заключается в защите микроорганизма от разных типов стресса [62-65]. «Платой» за такую способность, вероятно, является пониженная биоэнергетическая эффективность оксидазы типа bd по сравнению с ГМО. В отличие от ГМО цитохром bd, выделенный из E. coli и Azotobacter vinelandii, представлен стабильным оксигенированным комплексом [66]. Также замечено, что повышенная экспрессия bd фермента происходит при снижении парциального давления кислорода. Эти особенности цитохрома bd, вероятно, связаны с его высоким сродством к O_2 [67, 68]. Содержание цитохрома bd также возрастает при наличии в среде цианида, разобщителей-протонофоров, ее защелачивании [69] и в других неблагоприятных условиях, при которых традиционные ГМО не способны нормально функционировать, а «альтернативная» bd-оксидаза успешно работает. У азотофиксирующих бактерий цитохром bd обеспечивает защиту чувствительной к кислороду нитрогеназы путем поглощения О₂ с очень высокой скоростью, тем самым поддерживая его концентрацию на достаточно низком уровне.

Удалось выявить незаменимую роль терминальных оксидаз типа bd в функционировании дыхательной цепи $E. \, coli$ в условиях высокой концентрации H₂S в кишечнике. Обнаружено, что в присутствии дыхательных субстратов (дитиотреитола и убихинола-1) H₂S полностью ингибирует кислород-редуктазную активность ГМО (цитохрома bo_3), но не влияет на активность цитохромов bd (bd-I и bd-II) $E. \, coli$ [70]. Таким образом, благодаря своей нечувствительности к этому кишечному газу оксидаза типа bd делает возможной работу дыхательной цепи $E. \, coli$ и, вероятно, других

представителей микробиоты кишечника при высоком содержании сульфида. Также установлено, что цитохром bd-I из E. coli делает бактериальную клетку устойчивой к окиси азота (NO) [62, 63, 71-74], перекиси водорода [75, 76] и пероксинитриту [77]. Вероятно, именно благодаря этим и другим особенностям цитохром bd является ключевой оксидазой у ряда болезнетворных микроорганизмов, среди которых Mycobacterium tuberculosis, Klebsiella pneumoniae, Streptococcus agalactiae, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Listeria monocytogenes, Brucella abortus и Bacteroides fragilis [64]. При этом отмечена положительная корреляция между уровнем его экспрессии и вирулентностью патогенов [51]. Причина, возможно, в том, что активные формы кислорода и азота генерируются иммунной системой организма и от них атакующей бактерии нужно защищаться. Поскольку цитохром bd у человека и животных отсутствует, его можно было бы использовать в качестве терапевтической мишени для разрабатываемых новых антибактериальных препаратов.

Экспериментально наиболее подробно изучен цитохром bd-I из E. coli. Фермент типа bd состоит из двух основных субъединиц - CydA и СуdВ. У цитохрома bd-I Е. coli молекулярная масса этих субъединиц составляет 57 и 43 кДа соответственно. Каждая из них является типичным интегральным мембранным белком. Кроме того, согласно недавним исследованиям, в комплексе цитохромов bd протеобактерий присутствует третья субъединица - маленький белок (4 кДа) [78]. В случае цитохрома bd-I E. coli этот полипептид назвали CydX [78]. У bd-оксидаз ряда других бактерий он имеет обозначение CydY, CydZ или CydS. Полагают, что третья субъединица нужна для поддержания активности фермента и/или вносит вклад в стабилизацию гемов [78]. В цитохроме bd обнаруживают три активных редокс-кофактора: один низкоспиновый (гем b₅₅₈) и два высокоспиновых (гемы b₅₉₅ и d) [79, 80], а также сайт связывания и окисления хинола (так называемая «Q-петля» – гидрофильная область субъединицы CydA, соединяющая трансмембранные α-спирали 6 и 7); она обращена во внеклеточное (или периплазматическое) пространство.

Трехмерная структура *bd* фермента из *G. thermodenitrificans K1041*, полученная с разрешением 3,1–4 Å, подтверждает, что в его состав входят три субъединицы: СуdA, СуdB и СуdS [54]. Белковый комплекс содержит 19 трансмембранных α -спиралей: по 9 α -спиралей приходится на субъединицы СуdA и СуdB, а 19-я α -спираль принадлежит СуdS. Следует отметить, что СуdS *G. thermodenitrificans K1041* не имеет гомологии с первичной последовательностью СуdX *E. coli*. Для CydA и CydB *G. thermodenitrificans K1041* наблюдается одинаковая укладка, что, вероятно, произошло из-за дупликации единственного гена-предка, который кодировал гомодимерный фермент, а также более поздних мутаций. При сравнении пространственных структур терминальных оксидаз двух разных семейств видно, что ГМО имеют более компактную упаковку в мембране, чем *bd* оксидаза [54].

Несмотря на одинаковую укладку двух основных субъединиц цитохрома bd, все три гемовые группы (*b*₅₅₈, *b*₅₉₅ и *d*), как и «Q-петля», ассоциированы только с субъединицей CydA (рис. 4). Нечто подобное наблюдается в фотосинтетических реакционных центрах: хотя их ядро представлено двумя структурно сходными субъединицами, в переносе электрона участвует лишь одна из них [42, 81]. Гемы b₅₅₈ и b₅₉₅ представляют собой протогемы IX. В геме d один из пропионатов и один из двух дополнительных гидроксилов образуют спиролактоновое кольцо, то есть он является иис-гем d гидроксихлорин у-спиронолактоном [51]. Наличие гема типа *d* в активном центре терминальной оксидазы – уникальная черта bd ферментов, отличающая их от всех известных представителей ГМО. В качестве аксиальных лигандов редокс-кофакторы цитохрома bd G. thermodenitrificans K1041 используют аминокислотные остатки субъединицы СуdА: гем b₅₅₈ – H186 и M325 (у *E. coli* – H186 и М393), гем b₅₉₅ – H21 и E101 (у *E. coli* – H19 и Е99), гем d – Е378 (у E. coli – Е445) [51, 54]. Присутствие глутамата в качестве аксиального лиганда гемового железа - также уникальная черта цитохрома bd. Пока не известно ни одного другого гемсодержащего белка, включая ГМО, который использовал бы остаток глутаминовой кислоты в такой роли [82]. Гем b₅₅₈ вовлечен в окисление дыхательного субстрата хинола, выступая в качестве первичного акцептора электронов. В этом смысле он функционально аналогичен низкоспиновому гему хинолоксидаз геммедного суперсемейства, к примеру, гему b цитохрома bo₃ E. coli [83]. Пентакоординированный гем *d* – главный редокс-активный сайт цитохрома bd. В этом сайте второй субстрат фермента, О₂, связывается, активируется и восстанавливается 4-мя электронами до 2H₂O [59, 67, 68]. Таким образом, гем *d* выполняет кислородредуктазную функцию высокоспинового гема $a_3, b_3,$ или o_3 в ГМО. При этом оксидазы типа bd, как правило, обнаруживают гораздо более высокое сродство к кислороду, чем ГМО: например, значения констант связывания кислорода цитохрома bd-I из E. coli и ЦО из митохондрий сердечной мышцы быка составляют 0,3 и 40-280 мкМ соответственно [67].

Примечательная и неожиданная особенность трехмерной структуры цитохрома bd G. thermodenitrificans K1041 заключается в треугольном расположении гемовых групп, причем расстояние между гемами b_{558} и b_{595} оказалось большим, чем между b_{558} и *d*. Так, расстояние между центральными ионами железа гемов b_{558} и $b_{595} - 19,4$ Å, а между b_{558} и d - 15,2 Å. Аналогично расстояние между краями гемов b_{558} и $b_{595} - 8,5$ Å, а гемов b_{558} и d - 5,9 Å [54]. Данные рентгеноструктурного анализа позволили Safarian et al. [54] предложить следующую модель внутрибелкового электронного транспорта: электрон с хинола переносится на гем b_{558} , затем на гем d, после чего перераспределяется («уравновешивается») между гемами *d* и *b*₅₉₅. В пользу этой модели свидетельствует тот факт, что между ионами железа гемов b_{558} и d располагается высококонсервативный остаток W374 [54], который мог бы играть важную роль в переносе электрона между гемами. Следует отметить, что консервативный остаток триптофана обнаруживается и между низкоспиновым и высокоспиновым гемами ГМО, а также между бактериофеофитином и хиноном Q_A в активной ветви переноса электрона фотосинтетических реакционных центров [42, 81]. Тем не менее результаты более позднего исследования цитохрома bd-I из E. coli, проведенного Murali и Gennis [82] с использованием направленного мутагенеза, не вполне согласуются с моделью переноса электронов, предложенной Safarian et al. Согласно выводам работы Murali и Gennis, электрон с гема b_{558} не может напрямую прийти на гем *d*. Сначала он переносится на гем b_{595} и только после этого оказывается на геме d [82]. Заключение Murali и Gennis полностью соответствует гипотетической последовательности переноса электрона в bd ферменте, предложенной еще до расшифровки пространственной структуры цитохрома bd G. thermodenitrificans K1041 [53]. Стоит также подчеркнуть, что последовательность переноса электрона между гемами, постулированная Safarian et al., может быть реализована только в анаэробных условиях. В физиологических условиях, т.е. в присутствии кислорода, приход электрона с гема b_{558} на гем d вызывал бы очень быстрое связывание последнего с О2 с образованием прочного оксикомплекса, что не позволило бы этому электрону уйти с оксигенированого гема *d* на гем b_{595} . Таким образом, несмотря на наличие опубликованной трехмерной структуры, точная последовательность внутрибелкового переноса электрона между гемами в цитохроме bd пока не известна; ее установление требует дальнейших исследований.

Функция высокоспинового гема b_{595} все еще остается не выясненной. Получены данные,

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

указывающие на его возможное взаимодействие с перекисью водорода [76, 84] и окисью углерода [80, 85-87]. Действительно, один из двух аксиальных лигандов (остаток глутамата) - слабый, ввиду относительно слабых взаимодействий между гемовым железом и карбоксилатным фрагментом, которые, вероятно, являются в основном ионными, а не ковалентными из-за низкой основности карбоксильной группы [82]. Поэтому его замещение более сильным экзогенным лигандом, таким как H_2O_2 или CO, представляется вполне возможным. Расстояние между центральными ионами железа гема d и гема b_{595} в цитохроме bd G. thermodenitrificans K1041 составляет 11,6 Å [54]. Эта величина полностью соответствует рассчитанной ранее на основе моделирования спектров кругового дихроизма цитохрома bd-I E. coli [88] и константы скорости быстрого переноса электрона с d на b_{595} в том же ферменте [89]. Однако эти высокоспиновые гемы структурный биядерный центр, вероятнее всего, не образуют. Для формирования такого центра расстояние между его редокс-компонентами должно быть гораздо меньше. Так, расстояние между гемом a_3 и ионом меди Cu_B, составляющими биядерный центр ЦО, всего 4,5-5,2 Å (ссылки в статье Siletsky [42]). Поэтому гем b_{595} ,



Рис. 4. Схема устройства оксидазы типа *bd*. Показаны три составляющие ее субъединицы: I (CydA), II (CydB) и III (CydX – у *E. coli*, CydS – у *G. thermodenitrificans K1041*). Субъединица I несет на себе сайт окисления хинола, а также три гема: b_{558} , b_{595} и *d*. При окислении хинола протоны высвобождаются на внешнюю, положительно заряженную сторону мембраны, обращенную во внеклеточное (или периплазматическое) пространство. Также показаны два предполагаемых трансмембранных протон-проводящих пути: CydA- и CydB-каналы. Оба пути ведут из отрицательно заряженной цитоплазматической стороны мембраны к гему b_{595} .

С цветным вариантом рис. 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/

скорее всего, не выполняет ту же функцию в bd оксидазе, что и Cu_B в ГМО. Тем не менее относительно небольщое расстояние между краями гемов b₅₉₅ и d (3,5 Å [54]) подразумевает возможность ван-дер-ваальсовых взаимодействий между этими кофакторами. При наличии таких взаимодействий между b_{595} и d может осуществляться быстрый межгемовый перенос электрона. Изучение процесса фотолиза СО от одноэлектронной формы изолированной оксидазы bd-I E. coli и последующей рекомбинации, проведенное Siletsky et al. [89, 90] с помощью импульсной абсорбционной спектрофотометрии с микросекундным временным разрешением, действительно указывает на возможность обмена электроном между гемом b_{595} и гемом d в интервале 0,2-1,5 мкс. В ходе реакции четырехэлектронного восстановления O_2 до $2H_2O$ гем b_{595} мог бы обеспечивать подачу на гем d электрона и, возможно, протона с высокой скоростью. В связи с этим можно считать, что гем b_{595} совместно с гемом d образует функциональный двухгемовый центр для эффективного проведения кислородредуктазной реакции. Большое количество данных спектроскопии, полученных на цитохромах bd из E. coli и A. vinelandii, говорит в пользу такой гипотезы [58-60, 79, 85, 86, 88, 91-96]. Важно отметить, что анализ спектров кругового дихроизма изолированной оксидазы bd-I E. coli свидетельствует о наличии сильного экситонного взаимодействия между гемом b_{595} и гемом d [88]. В то же время в цитохроме bd G. thermodenitrificans К1041 в тех же экспериментальных условиях экситонное взаимодействие между двумя высокоспиновыми редокс-кофакторами заметно ниже [80]. Такая разница могла бы объясняться различиями в величине угла между плоскостями порфириновых колец гема b_{595} и гема d у этих bdоксидаз. Другое объяснение, которое представляется нам менее вероятным, состоит в том, что выявленные отличия отражают разницу в расстоянии между этими гемами в цитохроме bd G. thermodenitrificans K1041 и оксидазе bd-1 E. coli, пространственная структура которой пока не опубликована.

Анализ пространственной структуры указывает на существование двух потенциальных трансмембранных внутрибелковых протон-проводящих путей: одного – в субъединице СуdA, другого – в СуdB. В соответствии с названиями субъединиц эти гипотетические пути для переноса протонов в цитохроме *bd G. thermodenitrificans K1041* назвали CydA- и CydB-каналами. Стоит отметить, что за 11 лет до опубликования первой трехмерной структуры цитохрома *bd* Belevich et al. [58] на основании электрометрических и спектрофотометрических данных впервые постулировали необходимость существования протонпроводящего пути для доставки субстратных протонов из цитоплазмы в кислородоредуктазный центр фермента, что должно сопровождаться генерацией протон-движущей силы.

Предполагается, что CvdA-канал составляют аминокислотные остатки Н128, Q39, Y115, T58, E108, S139, S142 и E101. Как уже упоминалось выше, E101 образует связь с железом гема b_{595} , таким образом, являясь 6-м аксиальным лигандом этого редокс-кофактора. Важная роль высококонсервативного аминокислотного остатка Е108 (у *E. coli* - E107) во внутрибелковом трансмембранном проведении протонов была предсказана ранее Borisov et al. [60] на основании результатов исследования мутантной формы E107L цитохрома bd-I E. coli методами электрометрии и абсорбционной спектроскопии с микросекундным временным разрешением. Обнаружено, что замена глутамата на лейцин ведет к потере ферментом убихинол-1-оксидазной активности. В режиме одного молекулярного оборота фермента показано, что при смешивании полностью восстановленной мутантной формы E107L цитохрома bd-I с кислородом образование феррильного интермедиата существенно замедляется в сравнении с оксидазой дикого типа, что также сопровождается значительным снижением скорости генерации мембранного потенциала. Кроме того, найдено, что в отличие от цитохрома bd-I дикого типа фотодиссоциация молекулы СО из ее комплекса с восстановленным гемом d в одноэлектронной форме мутантного фермента E107L не приводит к внутрибелковому перераспределению электрона между гемами и сопряженной с ним генерации мембранного потенциала [60].

СуdВ-канал, по-видимому, формируют аминокислотные остатки субъединицы СуdВ: H36, S32, Y103, D25, R99, Y18, а также T73 субъединицы СуdА. Протон с T73, вероятно, может переноситься на пропионатную группу O1/2A гема *b*₅₉₅.

Таким образом, оба пути ведут из цитоплазмы к гему b_{595} , находящемуся в толще бислоя на расстоянии примерно 22,5 Å от внеклеточной (или периплазматической) стороны мембраны [54]. Дальнейший путь переноса протонов от гема b_{595} к гему d в структуре не прослеживается. На основании анализа полученной трехмерной структуры цитохрома bd Safarian et al. [54] исключают возможность прямого переноса протона между двумя высокоспиновыми гемами. Представляется более вероятным, что перенос протона с гема b_{595} на гем d обеспечивается цепочкой молекул воды, которые не видны при данном разрешении (3,1–4 Å).

Не ясно, использует ли фермент один или оба пути для трансмембранного переноса про-

тонов. Имеющиеся данные по одиночной замене E107 [60], ключевого аминокислотного остатка CydA-канала в цитохроме *bd*-I *E. coli*, указывают на то, что этот канал активен. Каких-либо сведений о функционировании (или не функционировании) гипотетического CydB-канала в литературе пока нет.

Belevich et al. [58] постулировали существование двух ионизируемых групп, чувствительных к редокс-состоянию высокоспиновых гемов. На основании разрешенного во времени электрометрического и оптического исследований мутантной формы E445A цитохрома bd-I E. coli было показано, что остаток глутамата (у G. thermodeni*trificans K1041* – E378), скорее всего, является одной из таких групп. Предположили, что эти гемосопряженные группы требуются для компенсации отрицательных зарядов двух электронов, которые переносятся на два высокоспиновых гема для их восстановления [58]. Важную роль в компенсации заряда при восстановлении гема *b*₅₉₅ может играть аминокислотный остаток E101, которым «заканчивается» СудА-канал. Протон, пришедший на E101 по CydA-каналу, мог бы переноситься на Е378 для компенсации отрицательного заряда второго электрона, используемого для восстановления высокоспиновых гемов. Альтернативная возможность протонирования Е378 заключается в том, что протон мог бы приходить на Е378 с внеклеточной (или периплазматической) стороны мембраны. В этом случае маловероятно, что этот протон используется в кислород-редуктазной реакции [58].

Хотя CydA-канал, скорее всего, участвует в проведении протонов, его точная функция пока не определена. Нельзя исключить, что этот канал переносит протоны только для компенсации заряда при восстановлении высокоспинового гема. Другая возможность состоит в том, что E108 является «точкой ветвления», то есть обладает способностью к переносу протонов через пропионатную группу O1/2D гема b_{595} на кислород-редуктазный сайт. Согласно структуре, пропионатные группы гема b_{595} находятся в гидрофобном окружении без какой-либо компенсации заряда [54]. По этой причине они, скорее всего, протонированы и могли бы служить в качестве доноров субстратных протонов для реакции восстановления кислорода до воды. Ушедшие с пропионатных групп протоны могли бы восполняться путем задействования одного или обоих протонных каналов.

На рис. 5 представлена предполагаемая схема каталитического цикла оксидазы типа *bd*. Она базируется на исследовании цитохрома *bd*-I *E. coli* в режиме одного молекулярного оборота с использованием метода «флоу-флэш» в сочета-

нии со спектрофотометрическими и электрометрическими измерениями [57-61]. Фотолиз СО из ее комплекса с полностью восстановленным цитохромом bd (**R**³-**CO**, $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$ -**CO**) приводит к образованию свободной от этого лиганда формы фермента (\mathbf{R}^3 , $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$). В присутствии кислорода **R**³ связывает эту двухатомную молекулу с $k_{on} \sim 2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [59, 68], образуя оксикомплекс гема d — соединение A^3 $(b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}-O_2)$. А³ превращается с $\tau \sim 4,5$ мкс в другое короткоживущее соединение, которое назвали Р. Впервые его зарегистрировали Belevich et al. [59] при температуре 21 °C. Показано, что $\mathbf{R}^3 \rightarrow \mathbf{A}^3$ и $\mathbf{A}^3 \rightarrow \mathbf{P}$ переходы не сопряжены с генерацией мембранного потенциала ферментом, встроенным в липосомы [59-61]. Belevich et al. [59] предположили, что соединение Р представляет собой истинный перекисный комплекс или оксоферрильный интермедиат: с аминокислотным радикалом либо с катион-радикалом порфиринового кольца. Позже Paulus et al. [97] сообщили, что, по их данным, соединение Р – оксоферрильный интермедиат с катион-радикалом порфиринового кольца [97]. В результате сейчас принято полагать, что в этом соединении гем d уже находится в оксоферрильном состоянии, причем с л-катион-радикалом на порфириновом кольце, то есть Р имеет структуру $\bar{b}_{558}^{2+} \bar{b}_{595}^{3+} d^{*4+} = O^{2-}$. Предполагается, что в ходе $A^3 \rightarrow P$ перехода на молекулу O_2 одновременно переносятся четыре электрона и два протона, приводя к разрыву О-О связи с образованием одной молекулы Н₂О. При этом два электрона поступают за счет окисления иона Fe^{2+} гема d до оксоферрильного состояния Fe⁴⁺=O²⁻. Один электрон — в результате окисления иона Fe^{2+} гема b_{595} до Fe³⁺. Еще один электрон берется из порфиринового кольца гема d, приводя к образованию π-катион-радикала. Похожий интермедиат (Р_м) находят в каталитическом цикле ЦО, однако в нем регистрируют не катион-радикал порфиринового кольца, а нейтральный тирозильный радикал [2]. Следует, однако, заметить, что в отличие от Belevich et al. [59] Paulus et al. [97] проводили эксперименты в условиях, далеких от физиологических - при температуре 1 °С. По этой причине полной уверенности в точном определении структуры соединения **Р** в каталитическом цикле цитохрома bd пока нет.

Далее следует **Р →F** переход с $\tau \sim 47$ мкс, в ходе которого, по-видимому, происходит «гашение» π -катион-радикала порфиринового кольца гема *d* за счет электрона, пришедшего с иона Fe²⁺ гема b_{558} . Соответственно, соединение **F** имеет структуру $b_{558}^{3+} d_{559}^{3+} d^{4+} = O^{2-}$. Оно, скорее всего, аналогично каталитическому интермедиату **F**, описанному у ЦО. **Р** \rightarrow **F** переход сопряжен с переносом заряда поперек мембраны, т.е. является электрогенным [59–61]. В случае трехэлектронной формы фермента реакция останавливается на образовании соединения **F** [57]. Если же фермент имеет в своем составе связанный хинол, окисление последнего в присутствии O₂ позволяет осуществить превращение **F** в соединение **A**¹ с $\tau \sim 600-1100$ мкс [58, 59]. **A**¹, вероятнее всего, является оксигенированной формой восстановленного гема *d* в ферменте с одним электроном ($b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{2+}-O_2$). Этот переход, как и предыдущий, электрогенен [58, 59].

Генерация мембранного потенциала в **Р** \rightarrow **F** и **F** \rightarrow **A**¹ переходах, по-видимому, обусловлена переносом H⁺ по протон-проводящему пути (СуdА- или/и СуdВ-каналу) из цитоплазмы в активный центр для восстановления O₂. Этот перенос заряда (H⁺) поперек мембраны, сопряженный с переносом электрона с гема b_{558} на высокоспиновые гемы b_{595} и d, вероятно, вносит основной вклад в генерацию потенциала, описанную в работах Jasaitis et al. [57], Belevich et al. [59, 59] и Вогізоv et al. [60, 61]. Кроме того, при окислении хинола протоны высвобождаются во внеклеточное (или периплазматическое) пространство, что также вносит вклад в образование цитохромом *bd* протон-движущей силы.

Показано, что в стационарных условиях, поддерживаемых O_2 и восстановленным дитиотреитолом убихиноном, в качестве основных каталитических интермедиатов цитохрома *bd* преобладают **A**¹ и **F** (примерно по 40% каждый) [98].



Рис. 5. Предполагаемый каталитический цикл оксидазы типа *bd*. Соединения в квадратах, нарисованных сплошными линиями (\mathbf{A}^3 , \mathbf{P} , \mathbf{F} , \mathbf{O}^1 , \mathbf{A}^1), – каталитические интермедиаты фермента. Соединения в квадратах, нарисованных пунктирными линиями (\mathbf{R}^3 , \mathbf{O}), скорее всего, не являются частью каталитического цикла цитохрома *bd*. Структура соединений обсуждается в тексте обзора

Оставшаяся часть фермента (~20%) в стационарных условиях, по-видимому, находится в состоянии O^1 – одноэлектронной форме фермента с окисленным гемом d ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}$ -OH). Эти данные вполне согласуются с давно известным фактом, что как в цитохром bd-содержащих мембранах, так и в изолированном ферменте гем *d* в основном находится в стабильных оксигенированном и оксоферрильном состояниях. Напротив, в случае ЦО, в стационарных условиях кислородные интермедиаты (в частности, Р и F) в скольких-нибудь значительных количествах не присутствуют (<10%) (ссылки в статье Borisov et al. [98]). Хотя соединение O^1 в режиме одного оборота цитохрома bd в опытах с задействованием метода «флоу-флэш» разрешено не было [57, 59, 60], вероятно, оно также является частью каталитического цикла (рис. 5). Следует также отметить, что в отличие от ЦО полностью окисленная (**O**, $b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{3+}$ -OH) и полностью восстановленная (\mathbf{R}^3) формы цитохрома bd, по-видимому, не входят в число его каталитичеких интермедиатов [98, 99], однако их можно генерировать искусственным путем.

Семейство оксидаз типа bd принято делить на два подсемейства: «L» и «S» [53, 80] (рис. 1). Классификация основана на размере «Q-петли». Ферменты подсемейства «L» содержат протяженную вставку на С-конце «Q-петли», поэтому такую петлю назвали «длинной» (Long Q-loop). К этому семейству относятся, к примеру, белковые комплексы bd-I и bd-II из E. coli. Ферменты подсемейства «S» не обладают этой вставкой, и поэтому их петля «короткая» (Short Q-loop). Наиболее изученный представитель подсемейства (S) - bd оксидаза из G. thermodenitrificans [54]. Данные, полученные Arutyunyan et al. [80] с использованием методов абсорбционной спектроскопии, КД и МКД, указывают на то, что bdферменты из двух разных подсемейств, «L» и «S», могут существенно различаться по организации активного центра [80]. Некоторые из представителей подсемейства «S» способны поддерживать дыхание даже в присутствии 1 мМ КСN [53]. В силу этой примечательной особенности их нередко выделяют в особую группу «цианид-резистентных оксидаз». Состав гемов этих ферментов не вполне ясен; однако установлено, что по крайней мере у некоторых из них гем *d* замещен на гем *b* [100].

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-14-00063).

Благодарности. Авторы признательны В.П. Скулачеву, А.А. Константинову и А.Д. Ви-

ноградову за интерес к работе, полезное обсуждение и критические замечания.

Конфликт интересов. Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Hemp, J., and Gennis, R.B. (2008) Diversity of the hemecopper superfamily in archaea: insights from genomics and structural modeling, Results Probl. Cell Differ., 45, 1-31, doi: 10.1007/400 2007 046.
- 2 Siletsky, S.A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome c oxidase, Front. Biosci. (Landmark Ed)., 18, 36-57.
- Wikstrom, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome 3. c oxidase in mitochondria, Nature, 266, 271-273, doi: 10.1038/266271a0.
- Ter Beek, J., Krause, N., and Adelroth, P. (2016) 4. Investigating the proton donor in the NO reductase from Paracoccus denitrificans, PLoS One, 11, e0152745, doi: 10.1371/journal.pone.0152745.
- Pereira, M.M., and Teixeira, M. (2004) Proton pathways, ligand binding and dynamics of the catalytic site in haemcopper oxygen reductases: a comparison between the three families, Biochim. Biophys. Acta, 1655, 340-346, doi: 10.1016/j.bbabio.2003.06.003.
- Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Tomizaki, T., Yamaguchi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome c oxidase at 2,8 Å, Science, 272, 1136-1144, doi: 10.1126/science.272.5265. 1136.
- Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Muller, H., Peng, G., 7. and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of Paracoccus denitrificans cytochrome c oxidase: new insights into the active site and the proton transfer pathways, Biochim. Biophys. Acta, 1787, 635-645, doi: 10.1016/ j.bbabio.2009.04.003.
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., 8 Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome c oxidases from Rhodobacter sphaeroides, J. Mol. Biol., 321, 329-339, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00619-8.
- 9 Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikstrom, M. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from Escherichia coli and its ubiquinone binding site, Nat. Struct. Biol., 7, 910-917, doi: 10.1038/82824.
- 10. Letts, J.A., Fiedorczuk, K., and Sazanov, L.A. (2016) The architecture of respiratory supercomplexes, Nature, 537, 644-648, doi: 10.1038/nature19774.
- 11. Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome c oxidase, Chem. Rev., 115, 1936–1989, doi: 10.1021/cr500266a.
- Wikstrom, M., Sharma, V., Kaila, V.R., Hosler, J.P., and 12. Hummer, G. (2015) New perspectives on proton pumping in cellular respiration, Chem. Rev., 115, 2196-2221, doi: 10.1021/cr500448t.
- 13. Konstantinov, A.A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R.B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome c oxidase from Rhodobacter sphaeroides probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94, 9085-9090, doi: 10.1073/ pnas.94.17.9085.
- Siletsky, S.A., Pawate, A.S., Weiss, K., Gennis, R.B., and 14. Konstantinov, A.A. (2004) Transmembrane charge separa-

14 БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследований.

tion during the ferryl-oxo \rightarrow oxidized transition in a nonpumping mutant of cytochrome c oxidase, J. Biol. Chem., 279, 52558-52565, doi: 10.1074/jbc.M407549200.

- 15. Siletsky, S., Kaulen, A.D., and Konstantinov, A.A. (1999) Resolution of electrogenic steps couples to conversion of cytochrome c oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, Biochemistry, 38, 4853-4861, doi: 10.1021/ bi982614a.
- Belevich, I., Bloch, D.A., Belevich, N., Wikstrom, M., and 16. Verkhovsky, M.I. (2007) Exploring the proton pump mechanism of cytochrome c oxidase in real time, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 104, 2685-2690, doi: 10.1073/ pnas.0608794104.
- 17. Siletsky, S.A., Belevich, I., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M.I. (2009) Time-resolved $O_H \rightarrow E_H$ transition of the aberrant ba3 oxidase from Thermus thermophilus, Biochim. Biophys. Acta, 1787, 201-205, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.12.020.
- 18. Siletsky, S.A., Belevich, I., Belevich, N.P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M.I. (2011) Time-resolved single-turnover of caa3 oxidase from Thermus thermophilus. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, Biochim. Biophys. Acta, 1807, 1162-1169, doi: 10.1016/ j.bbabio.2011.05.006.
- 19. Siletsky, S.A., Belevich, I., Soulimane, T., Verkhovsky, M.I., and Wikstrom, M. (2013) The fifth electron in the fully reduced caa3 from Thermus thermophilus is competent in proton pumping, Biochim. Biophys. Acta, 1827, 1-9, doi: 10.1016/j.bbabio.2012.09.013.
- 20. Siletsky, S.A., Belevich, I., Belevich, N.P., Soulimane, T., and Wikstrom, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by ba_3 cytochrome c oxidase from Thermus thermophilus coupled to single electron injection into the O and O_H states, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 915–926, doi: 10.1016/j.bbabio.2017.08.007.
- Sharma, V., Karlin, K.D., and Wikstrom, M. (2013) 21. Computational study of the activated O_H state in the catalytic mechanism of cytochrome c oxidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 110, 16844-16849, doi: 10.1073/pnas. 1220379110.
- Drachev, L.A., Jasaitis, A.A., Kaulen, A.D., Kondrashin, A.A., 22 Liberman, E.A., Nemecek, I.B., Ostroumov, S.A., Semenov, A.Y., and Skulachev, V.P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
- Mamedov, M.D., Tyunyatkina, A.A., Siletsky, S.A., and 23. Semenov, A.Y. (2006) Voltage changes involving photosystem II guinone-iron complex turnover, Eur. Biophys. J., 35, 647-654, doi: 10.1007/s00249-006-0069-3.
- Siletsky, S.A., Mamedov, M.D., Lukashev, E.P., Balashov, S.P., Dolgikh, D.A., Rubin, A.B., Kirpichnikov, 24. M.P., and Petrovskaya, L.E. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from Exiguobacterium sibiricum, Biochim. Biophys. Acta, 1857, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.08.004.
- 25. Siletsky, S.A., Mamedov, M.D., Lukashev, E.P., Balashov, S.P., Dolgikh, D.A., Rubin, A.B., Kirpichnikov, M.P., and Petrovskaya, L.E. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from

Exiguobacterium sibiricum, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., **1860**, 1–11, doi: 10.1016/j.bbabio.2018.09.365.

- Zaslavsky, D.L., Smirnova, I.A., Siletsky, S.A., Kaulen, A.D., Millett, F., and Konstantinov, A.A. (1995) Rapid kinetics of membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase with the photoactive Ru(II)-Tris-bipyridyl derivative of cytochrome *c* as electron donor, *FEBS Lett.*, **359**, 27–30, doi: 10.1016/0014-5793(94)01443-5.
- Siletskiy, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T.V., Buse, G., Kaulen, A., and Konstantinov, A. (1999) Timeresolved generation of a membrane potential by ba₃ cytochrome c oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear center, *FEBS Lett.*, **457**, 98–102, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01019-4.
- Siletsky, S.A., Kaulen, A.D., and Konstantinov, A.A. (1997) Electrogenic events associated with peroxy- to ferry-oxo state transition in cytochrome *c* oxidase, *Eur. Biophys. J.*, 26, 98.
- Siletsky, S.A., Han, D., Brand, S., Morgan, J.E., Fabian, M., Geren, L., Millett, F., Durham, B., Konstantinov, A.A., and Gennis, R.B. (2006) Single-electron photoreduction of the P_M intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1122–1132, doi: 10.1016/j.bbabio. 2006.07.003.
- Lee, A., Kirichenko, A., Vygodina, T., Siletsky, S.A., Das, T.K., Rousseau, D.L., Gennis, R., and Konstantinov, A.A. (2002) Ca²⁺-binding site in *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **41**, 8886–8898, doi: 10.1021/bi020183x.
- Kuznetsova, S.S., Azarkina, N.V., Vygodina, T.V., Siletsky, S.A., and Konstantinov, A.A. (2005) Zinc ions as cytochrome c oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry* (*Moscow*), **70**, 128–136.
- Siletsky, S.A., Zhu, J., Gennis, R.B., and Konstantinov, A.A. (2010) Partial steps of charge translocation in the non-pumping N139L mutant of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase with a blocked D-channel, *Biochemistry*, **49**, 3060–3073, doi: 10.1021/bi901719e.
- Verkhovsky, M.I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M.L., Morgan, J.E., and Wikstrom, M. (1999) Proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **400**, 480–483, doi: 10.1038/22813.
- Ruitenberg, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H. (2002) Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation, *Nature*, **417**, 99–102, doi: 10.1038/416099a.
- 35. Kaila, V.R., Sharma, V., and Wikstrom, M. (2011) The identity of the transient proton loading site of the protonpumping mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 80–84, doi: 10.1016/j.bbabio. 2010.08.014.
- 36. Capitanio, N., Palese, L.L., Capitanio, G., Martino, P.L., Richter, O.M., Ludwig, B., and Papa, S. (2012) Allosteric interactions and proton conducting pathways in proton pumping *aa*₃ oxidases: heme *a* as a key coupling element, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 558–566, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.11.003.
- Lu, J., and Gunner, M.R. (2014) Characterizing the proton loading site in cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 111, 12414–12419, doi: 10.1073/pnas.1407187111.
- De Vries, S. (2008) The role of the conserved tryptophan272 of the *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase in proton pumping, *Biochim. Biophys. Acta*, 1777, 925–928, doi: 10.1016/j.bbabio.2008.05.008.
- Brzezinski, P., and Larsson, G. (2003) Redox-driven proton pumping by heme-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1605, 1–13, doi: 10.1016/S0005-2728(03)00079-3.
- Arnold, S. (2012) The power of life cytochrome c oxidase takes center stage in metabolic control, cell signalling and

survival, *Mitochondrion*, **12**, 46–56, doi: 10.1016/j.mito. 2011.05.003.

- Siletsky, S.A., and Konstantinov, A.A. (2012) Cytochrome c oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 476–488, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.08.003.
- 42. Siletsky, S.A., Borisov, V.B., and Mamedov, M.D. (2017) Photosystem II and terminal respiratory oxidases: molecular machines operating in opposite directions, *Front. Biosci.* (*Landmark Ed.*), **22**, 1379–1426, doi: 10.2741/4550.
- 43. Rich, P.R., and Marechal, A. (2013) Functions of the hydrophilic channels in protonmotive cytochrome *c* oxidase, *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20130183, doi: 10.1098/rsif.2013.0183.
- 44. Sharma, V., Jambrina, P.G., Kaukonen, M., Rosta, E., and Rich, P.R. (2017) Insights into functions of the H channel of cytochrome *c* oxidase from atomistic molecular dynamics simulations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10339–E10348, doi: 10.1073/pnas.1708628114.
- 45. Rauhamaki, V., Bloch, D.A., and Wikstrom, M. (2012) Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb*₃, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7286–7291, doi: 10.1073/pnas.1202151109.
- Siletsky, S.A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A.A., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M.I. (2007) Time-resolved single-turnover of *ba*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383–1392, doi: 10.1016/j.bbabio.2007.09.010.
- 47. Kannt, A., Soulimane, T., Buse, G., Becker, A., Bamberg, E., and Michel, H. (1998) Electrical current generation and proton pumping catalyzed by the *ba*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *FEBS Lett.*, **434**, 17–22, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00942-9.
- 48. Rauhamaki, V., and Wikstrom, M. (2014) The causes of reduced proton-pumping efficiency in type B and C respiratory heme-copper oxidases, and in some mutated variants of type A, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 999–1003, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.02.020.
- Rauhamaki, V., Bloch, D.A., Verkhovsky, M.I., and Wikstrom, M. (2009) Active site of cytochrome *cbb*₃, *J. Biol. Chem.*, **284**, 11301–11308, doi: 10.1074/jbc. M808839200.
- Forte, E., Urbani, A., Saraste, M., Sarti, P., Brunori, M., and Giuffre, A. (2001) The cytochrome *cbb*₃ from *Pseudomonas stutzeri* displays nitric oxide reductase activity, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 6486–6491, doi: 10.1046/j.0014-2956.2001.02597.x.
- 51. Forte, E., Borisov, V.B., Vicente, J.B., and Giuffre, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171–234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
- 52. Borisov, V.B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565–574.
- Borisov, V.B., Gennis, R.B., Hemp, J., and Verkhovsky, M.I. (2011) The cytochrome bd respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 1398–1413, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.06.016.
- Safarian, S., Rajendran, C., Muller, H., Preu, J., Langer, J.D., Ovchinnikov, S., Hirose, T., Kusumoto, T., Sakamoto, J., and Michel, H. (2016) Structure of a bd oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases, *Science*, 352, 583–586, doi: 10.1126/science. aaf2477.
- 55. Gavrikova, E.V., Grivennikova, V.G., Borisov, V.B., Cecchini, G., and Vinogradov, A.D. (2009) Assembly of a chimeric respiratory chain from bovine heart submitochondrial particles and cytochrome *bd* terminal oxidase of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **583**, 1287–1291, doi: 10.1016/j.febslet.2009.03.022.

- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., and Skulachev, V.P. (1997) Generation of protonic potential by the *bd*-type quinol oxidase of *Azotobacter vinelandii*, *FEBS Lett.*, **414**, 369–372, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01047-8.
- Jasaitis, A., Borisov, V.B., Belevich, N.P., Morgan, J.E., Konstantinov, A.A., and Verkhovsky, M.I. (2000) Electrogenic reactions of cytochrome bd, Biochemistry, 39, 13800–13809, doi: 10.1021/bi001165n.
- Belevich, I., Borisov, V.B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A.A., Gennis, R.B., and Verkhovsky, M.I. (2005) Time-resolved electrometric and optical studies on cytochrome *bd* suggest a mechanism of electron-proton coupling in the di-heme active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3657–3662, doi: 10.1073/pnas.0405683102.
- Belevich, I., Borisov, V.B., and Verkhovsky, M.I. (2007) Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement, J. *Biol. Chem.*, 282, 28514–28519, doi: 10.1074/jbc. M705562200.
- 60. Borisov, V.B., Belevich, I., Bloch, D.A., Mogi, T., and Verkhovsky, M.I. (2008) Glutamate 107 in subunit I of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* is part of a transmembrane intraprotein pathway conducting protons from the cytoplasm to the heme b_{595} /heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907–7914, doi: 10.1021/bi800435a.
- Borisov, V.B., Murali, R., Verkhovskaya, M.L., Bloch, D.A., Han, H., Gennis, R.B., and Verkhovsky, M.I. (2011) Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 108, 17320–17324, doi: 10.1073/pnas.1108217108.
- Forte, E., Borisov, V.B., Konstantinov, A.A., Brunori, M., Giuffre, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, 56, 265–269.
- 63. Giuffre, A., Borisov, V.B., Mastronicola, D., Sarti, P., and Forte, E. (2012) Cytochrome *bd* oxidase and nitric oxide: from reaction mechanisms to bacterial physiology, *FEBS Lett.*, **586**, 622–629, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.035.
- Giuffre, A., Borisov, V.B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1178–1187, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.01.016.
- 65. Borisov, V.B., Forte, E., Siletsky, S.A., Arese, M., Davletshin, A.I., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: a potential target for next-generation antimicrobial agents, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 565–575, doi: 10.1134/S0006297915050077.
- Borisov, V.B., Smirnova, I.A., Krasnosel'skaya, I.A., and Konstantinov, A.A. (1994) Oxygenated cytochrome bd from Escherichia coli can be converted into the oxidized form by lipophilic electron acceptors, Biochemistry (Moscow), 59, 437–443.
- Belevich, I., Borisov, V.B., Konstantinov, A.A., and Verkhovsky, M.I. (2005) Oxygenated complex of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*: stability and photolability, *FEBS Lett.*, **579**, 4567–4570, doi: 10.1016/j.febslet. 2005.07.011.
- Belevich, I., Borisov, V.B., Bloch, D.A., Konstantinov, A.A., and Verkhovsky, M.I. (2007) Cytochrome *bd* from *Azotobacter vinelandii*: evidence for high-affinity oxygen binding, *Biochemistry*, 46, 11177–11184, doi: 10.1021/bi700862u.
- 69. Avetisyan, A.V., Bogachev, A.V., Murtasina, R.A., and Skulachev, V.P. (1992) Involvement of a *d*-type oxidase in the Na⁺-motive respiratory chain of *Escherichia coli* growing under low $\Delta \mu_{\rm H}^+$ conditions, *FEBS Lett.*, **306**, 199–202, doi: 10.1016/0014-5793(92)80999-W.
- 70. Forte, E., Borisov, V.B., Falabella, M., Colaco, H.G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R.K., Vicente, J.B., Sarti, P.,

БИОХИМИЯ том 84 вып. 11 2019

and Giuffre, A. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.

- Borisov, V.B., Forte, E., Konstantinov, A.A., Poole, R.K., Sarti, P., and Giuffre, A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide, *FEBS Lett.*, **576**, 201–204, doi: 10.1016/j.febslet.2004.09. 013.
- Borisov, V.B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A.A., and Giuffre, A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu_B-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, 580, 4823–4826, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.072.
- Borisov, V.B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A.A., and Giuffre, A. (2007) Redox control of fast ligand dissociation from *Escherichia coli* cytochrome *bd*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 97–102, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.118.
- Borisov, V. B., Forte, E., Giuffre, A., Konstantinov, A., and Sarti, P. (2009) Reaction of nitric oxide with the oxidized di-heme and heme-copper oxygen-reducing centers of terminal oxidases: different reaction pathways and end-products, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1185–1187, doi: 10.1016/ j.jinorgbio.2009.06.002.
- Borisov, V.B., Davletshin, A.I., and Konstantinov, A.A. (2010) Peroxidase activity of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 428–436, doi: 10.1134/S000629791004005X.
- Borisov, V.B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress, *FEBS Lett.*, 587, 2214–2218, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.047.
- 77. Borisov, V.B., Forte, E., Siletsky, S.A., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182–188, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.10.006.
- Hoeser, J., Hong, S., Gehmann, G., Gennis, R.B., and Friedrich, T. (2014) Subunit CydX of *Escherichia coli* cytochrome *bd* ubiquinol oxidase is essential for assembly and stability of the di-heme active site, *FEBS Lett.*, **588**, 1537–1541, doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.036.
- Borisov, V., Arutyunyan, A.M., Osborne, J.P., Gennis, R.B., and Konstantinov, A.A. (1999) Magnetic circular dichroism used to examine the interaction of *Escherichia coli* cytochrome *bd* with ligands, *Biochemistry*, **38**, 740–750, doi: 10.1021/bi981908t.
- Arutyunyan, A.M., Sakamoto, J., Inadome, M., Kabashima, Y., and Borisov, V.B. (2012) Optical and magneto-optical activity of cytochrome *bd* from *Geobacillus thermodenitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2087–2094, doi: 10.1016/j.bbabio.2012.06.009.
- Leonova, M.M., Fufina, T.Y., Vasilieva, L.G., and Shuvalov, V.A. (2011) Structure-function investigations of bacterial photosynthetic reaction centers, *Biochemistry (Moscow)*, 76, 1465–1483, doi: 10.1134/S0006297911130074.
- Murali, R., and Gennis, R.B. (2018) Functional importance of Glutamate-445 and Glutamate-99 in proton-coupled electron transfer during oxygen reduction by cytochrome bd from Escherichia coli, Biochim. Biophys. Acta, 1859, 577–590, doi: 10.1016/j.bbabio.2018.04.012.
- Borisov, V.B., and Verkhovsky, M.I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, 6, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
- Forte, E., Borisov, V.B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e01006–e01013, doi: 10.1128/mBio. 01006-13.

- Borisov, V.B., Sedelnikova, S.E., Poole, R.K., and Konstantinov, A.A. (2001) Interaction of cytochrome *bd* with carbon monoxide at low and room temperatures: evidence that only a small fraction of heme b₅₉₅ reacts with CO, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22095–22099, doi: 10.1074/jbc. M011542200.
- Borisov, V.B., and Verkhovsky, M.I. (2013) Accommodation of CO in the di-heme active site of cytochrome *bd* terminal oxidase from *Escherichia coli*, *J. Inorg. Biochem.*, **118**, 65–67, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2012.09.016.
- Siletsky, S.A., Dyuba, A.V., Elkina, D.A., Monakhova, M.V., and Borisov, V.B. (2017) Spectral-kinetic analysis of recombination reaction of heme centers of *bd*-type quinol oxidase from *Escherichia coli* with carbon monoxide, *Biochemistry (Moscow)*, 82, 1354–1366, doi: 10.1134/ S000629791711013X.
- Arutyunyan, A.M., Borisov, V.B., Novoderezhkin, V.I., Ghaim, J., Zhang, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A.A. (2008) Strong excitonic interactions in the oxygenreducing site of bd-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes d and b₅₉₅ is 10 Å, Biochemistry, 47, 1752–1759, doi: 10.1021/bi701884g.
- Siletsky, S.A., Rappaport, F., Poole, R.K., and Borisov, V.B. (2016) Evidence for fast electron transfer between the highspin haems in cytochrome bd-I from Escherichia coli, PLoS One, 11, e0155186, doi: 10.1371/journal.pone.0155186.
- Siletsky, S.A., Zaspa, A.A., Poole, R.K., and Borisov, V.B. (2014) Microsecond time-resolved absorption spectroscopy used to study CO compounds of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, 9, e95617, doi: 10.1371/ journal.pone.0095617.
- Borisov, V., Gennis, R., and Konstantinov, A.A. (1995) Peroxide complex of cytochrome *bd*: kinetics of generation and stability, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 975–982.
- Borisov, V.B., Gennis, R.B., and Konstantinov, A.A. (1995) Interaction of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* with hydrogen peroxide, *Biochemistry (Moscow)*, **60**, 231–239.
- 93. Vos, M.H., Borisov, V.B., Liebl, U., Martin, J.L., and Konstantinov, A.A. (2000) Femtosecond resolution of li-

gand-heme interactions in the high-affinity quinol oxidase *bd*: a di-heme active site? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 1554–1559, doi: 10.1073/pnas.030528197.

- 94. Borisov, V.B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J.L., Zhang, J., Gennis, R.B., Konstantinov, A.A., and Vos, M.H. (2002) Interactions between heme *d* and heme b_{595} in quinol oxidase *bd* from *Escherichia coli*: a photoselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry*, **41**, 1654–1662, doi: 10.1021/bi0158019.
- 95. Borisov, V.B. (2008) Interaction of *bd*-type quinol oxidase from *Escherichia coli* and carbon monoxide: heme *d* binds CO with high affinity, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 14–22, doi: 10.1134/S0006297908010021.
- 96. Rappaport, F., Zhang, J., Vos, M.H., Gennis, R.B., and Borisov, V.B. (2010) Heme-heme and heme-ligand interactions in the di-heme oxygen-reducing site of cytochrome bd from Escherichia coli revealed by nanosecond absorption spectroscopy, Biochim. Biophys. Acta, 1797, 1657–1664, doi: 10.1016/j.bbabio.2010.05.010.
- Paulus, A., Rossius, S.G., Dijk, M., and de Vries, S. (2012) Oxoferryl-porphyrin radical catalytic intermediate in cytochrome *bd* oxidases protects cells from formation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830–8838, doi: 10.1074/jbc.M111.333542.
- Borisov, V.B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffre, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503–509, doi: 10.1016/ j.bbabio.2011.02.007.
- 99. Yang, K., Borisov, V.B., Konstantinov, A.A., and Gennis, R.B. (2008) The fully oxidized form of the cytochrome *bd* quinol oxidase from *E. coli* does not participate in the catalytic cycle: direct evidence from rapid kinetics studies, *FEBS Lett.*, **582**, 3705–3709, doi: 10.1016/j.febslet.2008.09.038.
- 100. Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Konstantinov, A.A. (1999) A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168, J. Biol. Chem., 274, 32810–32817, doi: 10.1074/ jbc.274.46.32810.

FEATURES OF ORGANIZATION AND MECHANISM OF CATALYSIS OF TWO FAMILIES OF TERMINAL OXIDASES: HEME-COPPER AND bd-TYPE

Review

V. B. Borisov^{*,**} and S. A. Siletsky

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

> Received June 3, 2019 Revised July 9, 2019 Accepted July 10, 2019

Terminal oxidases of aerobic respiratory chains of organisms catalyze transfer of electrons from the respiratory substrate, cytochrome *c* or quinol, to O_2 to form $2H_2O$. There are two known families of these membrane-integrated oxidoreduc-tases: heme-copper oxidases and *bd*-type oxidases (cytochromes *bd*), the latter being found only in prokaryotes. The redox reaction catalyzed by these enzymes is coupled to the generation of a proton-motive force which is used by the cell to synthesize ATP and perform other useful work. Due to the presence of proton pump, heme-copper oxidases generate membrane potential with greater energy efficiency than cytochromes *bd*. The latter, however, play an important physiological role enabling bacteria, including pathogens, to survive and multiply in unfavorable environment. The recent data on the organization and molecular mechanisms of functioning of the two families' terminal oxidases are reviewed.

Keywords: respiratory chain, terminal oxidase, cytochrome oxidase, cytochrome *bd*, heme, catalytic cycle, oxygen intermediates, membrane potential, proton pump