

УДК 577.151.63

ВЛИЯНИЕ МЕМБРАННОГО ОКРУЖЕНИЯ НА ЛИГАНД-СВЯЗЫВАЮЩИЕ СВОЙСТВА ТЕРМИНАЛЬНОЙ ОКСИДАЗЫ ЦИТОХРОМА *bd-I Escherichia coli*

© 2020 В. Б. Борисов

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

Поступила в редакцию 10.07.2020

После доработки 05.09.2020

Принята к публикации 05.09.2020

Цитохром *bd-I* – терминальная оксидаза дыхательной цепи *Escherichia coli*. Этот интегральный мембранный белок содержит три редокс-активные простетические группы: гемы b_{558} , b_{595} и d . Фермент сопрягает перенос электронов от хинола на молекулярный кислород с генерацией протон-движущей силы и выполняет важные физиологические функции. В данной работе исследовали влияние мембранного окружения на способность цитохрома *bd-I* связывать лиганды. Использовали метод абсорбционной спектроскопии. Найдено, что мембранное окружение модулирует лиганд-связывающие характеристики гемопroteина как в окисленном, так и восстановленном состоянии. Изменения поглощения, наблюдаемые при добавлении экзогенного лиганда, такого как цианид или окись углерода (СО), к солюбилизованному в детергенте ферменту гораздо более обширны и неоднородны, чем в случае мембран. В нативных мембранах цианид и СО взаимодействуют в основном с гемом d . При изолировании фермента появляется добавочный сайт связывания лигандов (гем b_{558}), о чем свидетельствует увеличение изменений поглощения в полосе Soret. Эта дополнительная реакционная способность обнаруживается и при простой обработке мембран детергентом. Выявленный эффект не является тривиальной денатурацией, поскольку встраивание изолированного фермента в азолектиновые липосомы приводит к восстановлению лиганд-связывающих свойств, характерных для интактных мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром, терминальная оксидаза, дыхательная цепь, гем, мембранное окружение, связывание лиганда, *Escherichia coli*.

DOI: 10.31857/S032097252012012X

ВВЕДЕНИЕ

Цитохром *bd-I* – одна из трех терминальных оксидаз аэробной цепи переноса электронов *Escherichia coli* [1–5]. Фермент катализирует окисление восстановленного хинона (убихинола-8 или менахинола-8) молекулярным кислородом с образованием хинона и воды [6–9]. Подобно цитохром *c*-оксидазе и другим членам суперсемейства гем-медных оксидаз [10–16], цитохром *bd-I* сопрягает экзергоническую реакцию восстановления кислорода с генерацией протон-движущей силы [17, 18]. Однако гем-медные оксидазы являются истинными протонными насосами [19, 20], тогда как цитохром *bd-I* «помповые» протоны не перекачивает и ге-

нерирует мембранный потенциал только путем трансмембранного разделения зарядов [21–23]. В результате оксидаза типа *bd* функционирует с более низкой энергетической эффективностью по сравнению с дыхательными гем-медными ферментами [17, 24]. Белок экспрессируется в микроаэробных условиях [25, 26] и выполняет важные физиологические функции [27–30]. Фермент обеспечивает устойчивость бактериальной клетки к оксиду азота [31–35], пероксинитриту [36], сероводороду [37], перекиси водорода [38–43], но не к окиси углерода (СО) [44].

Трехмерная структура цитохрома *bd-I E. coli* недавно была определена с помощью одночастичной криоэлектронной микроскопии (cryo-EM) [45, 46]. Согласно структуре cryo-EM, в состав фермента входят четыре субъединицы. Еще совсем недавно считали, что цитохром *bd* состоит из двух субъединиц: CudA (~ 57 кДа) и CudB (~ 43 кДа) [47–49]. Позже была обнаружена третья, небольшая субъединица, которую назвали CudX (~ 4 кДа) [50–55]. Еще одна ма-

Принятые сокращения: BQCl₄ – тетрахлово-1,4-бензохинон; Ches – 2-(циклогексиламино)этансульфонат; СО – окись углерода; cryo-EM – одночастичная криоэлектронная микроскопия; E_m – потенциал полувосстановления; Neres – *N*-2-гидроксиэтилпиперазин-*N*-2-этансульфонат; SB-12 – додецил-*N,N*-диметиламин-3-пропансульфонат.

ленькая, четвертая субъединица, названная CydH [45] или CydY [46], была идентифицирована с помощью cryo-EM. CydA содержит сайт окисления хинола (Q-петля) и три гема – b_{558} , b_{595} и d . Цитохром $bd-I$ *E. coli* входит в состав подсемейства L (long Q-loop) оксидаз типа bd [4, 56]. С-концевая вставка из ~ 60 остатков в Q-петле играет роль в сборке и стабильности фермента *E. coli* [57, 58]. Гем b_{558} координируется His-186 и Met-393 и непосредственно участвует в окислении хинола [59–61]. Гем b_{595} имеет Glu-445 в качестве аксиального лиганда [45, 46]. Гем d координируется His-19 [45] либо Glu-99 [46] и является сайтом связывания O_2 и его превращения в $2H_2O$. Интересно, что имеются убедительные спектроскопические свидетельства того, что высокоспиновые гемы d и b_{595} образуют функциональный двухгемовый активный сайт [62–75]. Все гемовые аксиальные лиганды находятся в CydA. Вследствие высокого сродства к O_2 [76, 77] гем d в аэробных условиях обычно пребывает в стабильной окси-ферро форме [78–81]. Было продемонстрировано, что значения потенциалов полувосстановления (E_m) всех трех гемов чувствительны к рН, и что E_m гема b_{558} также чувствителен к типу детергента, используемого для солюбилизации белка [82].

Вопрос, на который предстояло ответить в ходе этого исследования, заключался в следующем: влияет ли мембранное окружение на лиганд-связывающие свойства цитохрома $bd-I$, включая протеолипосомы? Этот вопрос до сих пор оставался без ответа.

Понимание молекулярных механизмов функционирования белков, встроенных в мембрану, таких как переносчики и ферменты, требует знания того, как именно они взаимодействуют с мембранным липидным окружением [83]. Недавние исследования мембранных белков с использованием экспериментальных и вычислительных методов позволяют предположить, что липидные мембраны могут существенно влиять на локальную структуру, динамику и активность белков [83–86]. До сих пор нет исследований цитохрома bd либо других встроенных в мембрану дыхательных терминальных оксидаз с помощью вычислительных подходов, в которых был бы охарактеризован молекулярный механизм того, как мембрана влияет на свойства белков этого типа. Однако одна экспериментальная работа заслуживает внимания. Andreev и Konstantinov [87] исследовали связывание цианида с окисленной цитохром c -оксидазой субмитохондриальных частиц сердца быка, а также с ферментом, солюбилизованным в детергенте либо встроенным в липосомы. Они обнаружили, что значение K_D реакции кардинально за-

висит от окружения белка. Это значение увеличивается в 100–1000 раз при солюбилизации фермента, но уменьшается при встраивании изолированной цитохром c -оксидазы в липосомы [87].

В настоящем исследовании установлено, что реакционная способность гемовых центров цитохрома $bd-I$ существенно модулируется липидным окружением. Полученные результаты будут способствовать лучшему пониманию молекулярных механизмов функционирования терминальных оксидаз и других важных металл-связывающих редокс-белков.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические реактивы. В работе использовали триптон и дрожжевой экстракт фирмы «Difco» (США); тетрахлоро-1,4-бензохинон ($BQCl_4$) – «Aldrich» (США); N -лаурилсаркозинат натрия – «Fluka» (Швейцария); окись углерода, дитионит натрия, KCl , $MgSO_4$ – «Merck» (Германия); KCN – «Suprapur» (Германия); додецил- N,N -диметиламин-3-пропан-сульфонат (SB-12), персульфат аммония, холат натрия, ЭДТА, Ches, Нерес – «Serva» (Германия); азолектин (фосфатидилхолин тип II-S) – «Sigma» (США). Остальные реактивы были отечественного производства квалификации ос.ч. Все водные растворы готовили на дистиллированной воде, дополнительно очищенной с помощью установки «Milli-Q» («Millipore», США).

Бактериальный штамм. В работе использовали штамм *E. coli* GO105/pTK1, любезно предоставленный Р.Б. Геннисом (Иллинойский университет, США). Этот штамм сверхпродуцирует цитохром $bd-I$. Кроме того, в нем отсутствует цитохром bo_3 , что дает возможность получать препараты цитохрома $bd-I$ без примеси оксидазы bo_3 [61].

Выращивание клеток. Клетки *E. coli* выращивали аэробно при температуре $37^\circ C$ в ферментере с контролируемой подачей O_2 . Среда выращивания содержала 1%-ный триптон, 0,5%-ный дрожжевой экстракт, 0,17 М $NaCl$, 0,005%-ный канамицин и 0,01%-ный ампициллин, рН 7,2. Клетки выращивали до поздней логарифмической фазы роста и затем осаждали.

Получение мембран, выделение и очистка цитохрома $bd-I$. Получение мембран проводили, пропуская клеточную суспензию через пресс Френча, как описано в [69]. Цитохром $bd-I$ выделяли в соответствии с [88], опуская конечную стадию хроматографии на гидроксипатите.

Встраивание цитохрома $bd-I$ в фосфолипидные везикулы. Встраивание изолированного

фермента в азолектиновые липосомы проводили диализным методом, описанным Racker [89], с некоторыми модификациями. Смесь азолектина (40 мг/мл) с 2%-ным холатом натрия, 2 мМ MgSO₄, 50 мМ фосфатом калия, pH 7,5, продували аргоном в течение 10 мин. Затем полученную суспензию липида с детергентом обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового дезинтегратора УЗДН-2Т («Союз-Прибор», Россия) 2–4 раза по 20 с, с контролем температуры (0 °С) и при максимальном резонансе до полного ее просветления. После обработки ультразвуком к суспензии добавляли цитохром *bd*-I (под током аргона) так, чтобы соотношение белка и липида составляло 1 : 40. Затем раствор подвергали диализу против 300–500 объемов буфера, с трехкратной сменой буфера в течение 8 ч каждая. Состав буфера для диализа был тем же, что и буфера, используемого для обработки липидов ультразвуком, но без холата.

Измерения. Изменения поглощения регистрировали на спектрофотометре Aminco-SLM DW 2000 UV-Vis в кюветках с длиной оптического пути 10 мм при комнатной температуре. Состав среды, используемый в экспериментах, см. в подписях к рисункам.

Концентрацию цитохрома *bd*-I определяли из его разностного спектра поглощения (восстановленный дитионитом *минус* исходный), используя значение $\Delta\varepsilon_{628-607} = 10,8 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ [64].

Концентрацию белка определяли по методу Lowry et al. [90].

При обработке детергентом бактериальные мембраны (~ 40 мг белка/мл) разбавляли в 3,5 раза 75 мМ фосфатом калия, 150 мМ KCl, 5 мМ ЭДТА, pH 6,5. Затем добавляли детергент SB-12 до конечной концентрации 30 мг/мл. Полученную смесь инкубировали в течение 30 мин на льду при перемешивании.

Для перевода солюбилизованного цитохрома *bd*-I в полностью окисленное состояние его обрабатывали липофильными акцепторами электронов – VQCl₄ либо феррицинием с персульфатом аммония [80].

Обработка полученных данных. Данные обрабатывали с использованием программных пакетов GIM (Scientific Graphic Interactive Management System, разработан А.Л. Драчевым в МГУ им. М.В. Ломоносова) и Origin (OriginLab Corporation, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИСЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Взаимодействие цитохрома *bd*-I *E. coli* с цианидом. Добавление 50 мМ KCN к мембранам

E. coli, содержащим цитохром *bd*-I, приводит к заметным изменениям в разностном (обработанный цианидом *минус* исходный) спектре поглощения (рис. 1 и 2). В области α -полосы гема *d* наблюдается уменьшение поглощения при 649 нм (рис. 1, б и 2, б). Полоса поглощения при 647–650 нм характерна для т.н. оксикомплекса гема *d*, в котором гем восстановлен и связан с кислородом [78–80]. Оксикомплекс достаточно стабилен, что, вероятно, обусловлено высоким сродством гема d^{2+} к кислороду [76] и является одним из двух наиболее распространенных каталитических интермедиатов в стационарных условиях [81]. Провал при 648 нм свидетельствует о распаде оксикомплекса гема *d*, вызванного цианидом, и, вероятно, связывании лиганда с гемом *d*. Влияние цианида на спектр поглощения цитохрома *d* аэробной суспензии мембранных частиц *E. coli* было ранее изучено Pudek и Bragg [91]. Авторы также наблюдали исчезновение полосы поглощения при 648 нм после добавления цианида, но ошибочно объяснили этот распад реакцией лиганда с *ферриформой* гема *d*. Исследование Pudek и Bragg ограничилось измерениями в диапазоне длин волн от 600

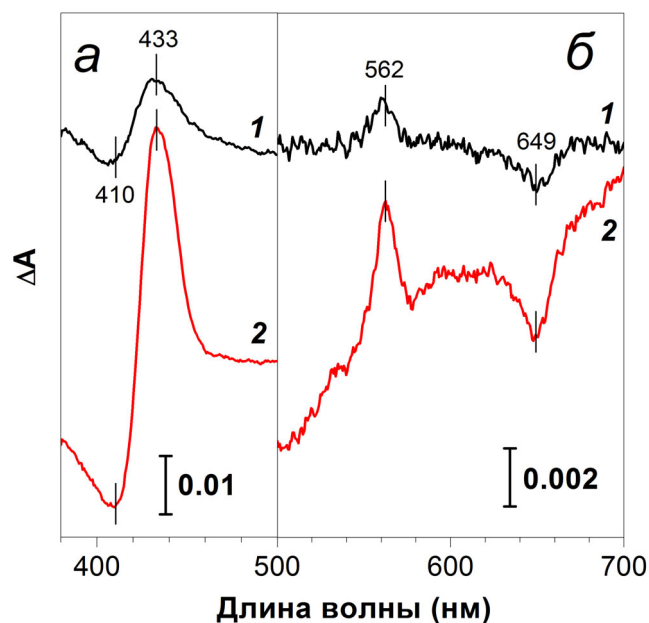


Рис. 1. Спектральные изменения связанного с мембраной цитохрома *bd*-I *E. coli* в полосе Соре (*а*) и видимой области (*б*), вызываемые цианидом. Представлены разностные спектры поглощения бактериальных мембран, содержащих цитохром *bd*-I (обработанные цианидом *минус* исходные), записанные через 5 с (*1*) и 11 мин (*2*) после добавления 50 мМ KCN. Буфер: 50 мМ Hepes, 50 мМ Ches, 50 мМ K₂SO₄, 10 мМ MgSO₄ и 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Концентрация цитохрома *bd*-I – 0,7 мкМ. (С цветными вариантами рис. 1, 3–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

до 700 нм (например, см. рис. 6 в [91]). Используя мембранные частицы *Azotobacter vinelandii*, Kauffman и Van Gelder [92] получили аналогичные результаты, но также исследовали только диапазон α -полосы гема *d*. В данной работе ис-

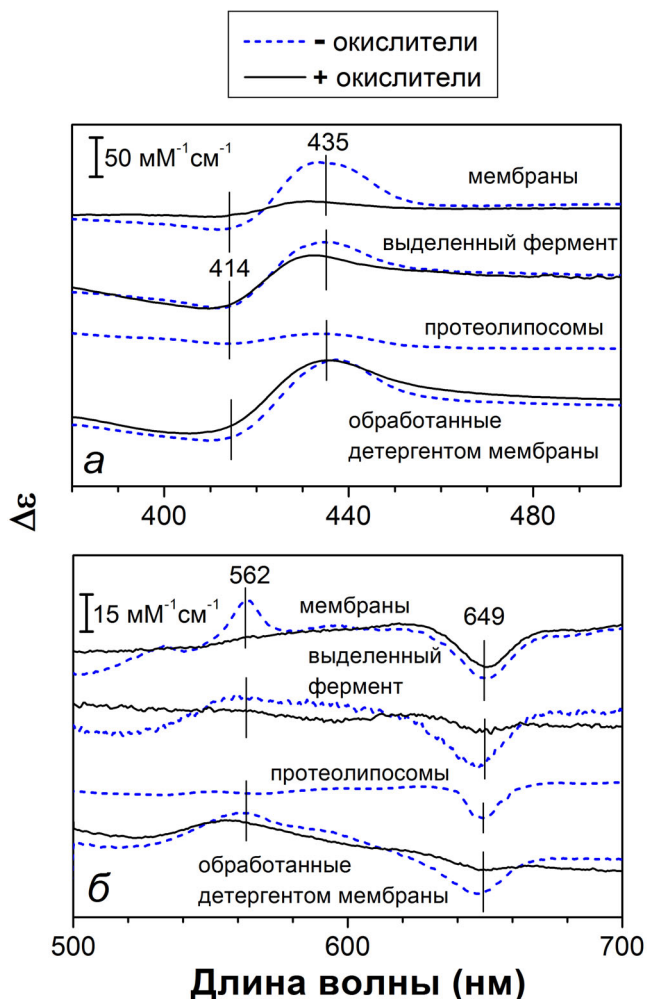


Рис. 2. Спектральные изменения разных форм цитохрома *bd-I* *E. coli* в полосе Сорета (*a*) и видимой области (*b*), вызываемые цианидом. Представлены разностные спектры поглощения нативных бактериальных мембран, содержащих цитохром *bd-I*; изолированного солюбилизованного фермента; цитохрома *bd-I*, встроенного в искусственные липосомы; и цитохром *bd-I*-содержащих бактериальных мембран после обработки детергентом SB-12. Разностные спектры «обработанные 50 мМ KCN минус «без добавок» обозначены пунктирными линиями, тогда как «обработанные 50 мМ KCN минус «после инкубации с окислителем в течение 10 мин» — сплошными. В случае изолированного солюбилизованного фермента в качестве окислителя использовали 4,8 мкМ VQCl_4 , а при работе с нативными и обработанными детергентом бактериальными мембранами — 40 мкМ феррициний с 0,2 мМ персульфатом аммония. Основная среда: 50 мМ Neres, 50 мМ Ches и 0,1 мМ ЭДТА, pH 8,0. Дополнительные компоненты: 50 мМ K_2SO_4 и 10 мМ MgSO_4 (нативные и обработанные детергентом мембраны); 0,05%-ный *N*-лаурилсаркозинат натрия (изолированный фермент)

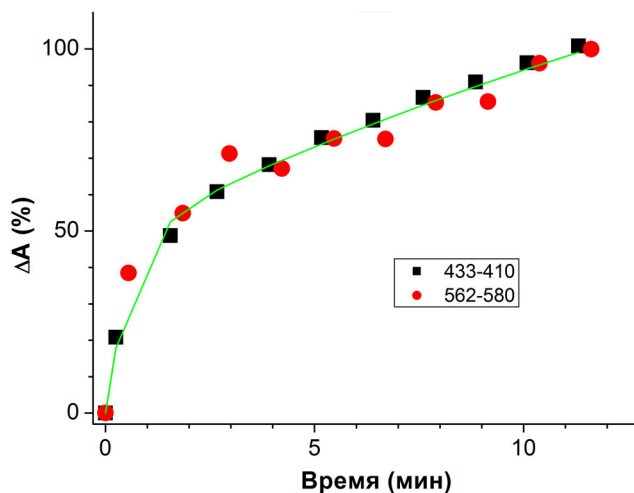


Рис. 3. Сопоставление кинетики изменений поглощения в Сорете и при 562 нм, вызываемых добавлением 50 мМ цианида к цитохром *bd-I*-содержащим мембранам *E. coli*. Условия как на рис. 1. Экспериментальные точки приведены в процентах от конечной величины ответа, взятой за 100%

следуемая спектральная область была расширена. Это позволило установить, что влияние цианида на цитохром *bd*-содержащие мембраны *E. coli* не ограничивается исчезновением α -полосы гема *d* с пиком при 649 нм. Добавление KCN также вызывает длинноволновый сдвиг полосы Сорета, не описанный ранее: наблюдается полоса с максимумом при 433 нм и минимумом при 410 нм (рис. 1, *a* и 2, *a*). Кроме того, обнаруживается увеличение поглощения при 562 нм (рис. 1, *b* и 2, *b*). Кинетика изменений поглощения в полосе Сорета очень похожа на кинетику, зарегистрированную при 562 нм (рис. 3), но не коррелирует с развитием провала 649 нм (данные не приведены). Значительная величина спектральных изменений в γ -области, вызванных цианидом ($\Delta\epsilon_{433-410} \sim 90 \text{ мМ}^{-1} \text{ см}^{-1}$ для спектра 2 на рис. 1, *a*), могла бы быть интерпретирована как связывание лиганда с гемом типа *b*. Известно, однако, что пик 562 нм, наблюдаемый на рис. 1, *b*, характерен для α -полосы гема b_{558} и β -полосы гема b_{595} в разностном (восстановленный минус окисленный) спектре поглощения цитохрома *bd-I* *E. coli* [70, 93, 94]. Кроме того, повышенное поглощение в районе 595 нм (спектр 2 на рис. 1, *b*) может быть признаком α -полосы восстановленного гема b_{595} [70, 93, 94]. Следовательно, поскольку развитие длинноволнового сдвига в полосе Сорета коррелирует с кинетикой появления пика при 562 нм (рис. 3), можно сделать вывод, что большая часть изменений в γ -полосе, вызванных цианидом, отражает восстановление гемов b_{558} и b_{595} эндогенными источниками электронов, а не взаимодействие лиганда с этими гемами.

Дальнейшее подтверждение этого вывода получили, изучив влияние цианида на спектры поглощения мембран *E. coli*, содержащих цитохром *bd-I*, в присутствии окислителей (рис. 2 и 4). Следует отметить, что в отличие от выделенного изолированного фермента, который может быть переведен в полностью окисленное состояние липофильными окислителями [80], прединкубация цитохром *bd-I*-содержащих бактериальных мембран с окислителями феррицинием и персульфатом аммония не приводит к распаду оксикомплекса и окислению гема *d* (данные не приведены). В течение первых 4–5 мин после добавления цианида к выделенным мембранам, предварительно инкубированным с окислителями, происходят изменения поглощения, аналогичные изменениям в отсутствие окислителей: длинноволновый сдвиг полосы *Soret* со значением $\Delta\epsilon_{433-410}$, достигающим $\sim 50 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, и увеличение поглощения при 562 нм (рис. 4). Затем, однако, происходит медленное обращение этих спектральных изменений и в конце концов возникает устойчивый ответ в области *Soret* с $\Delta\epsilon_{430-410} \sim 20 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$, при этом пик при 562 нм отсутствует (спектр 3 на рис. 4). Кинетики индуцированных цианидом изменений поглощения в γ -области и при 561 нм очень похожи (рис. 5), вероятно, отражая один и тот же процесс – промежуточное восстановление гемов типа *b* эндогенным донором электронов с последующим их ре-

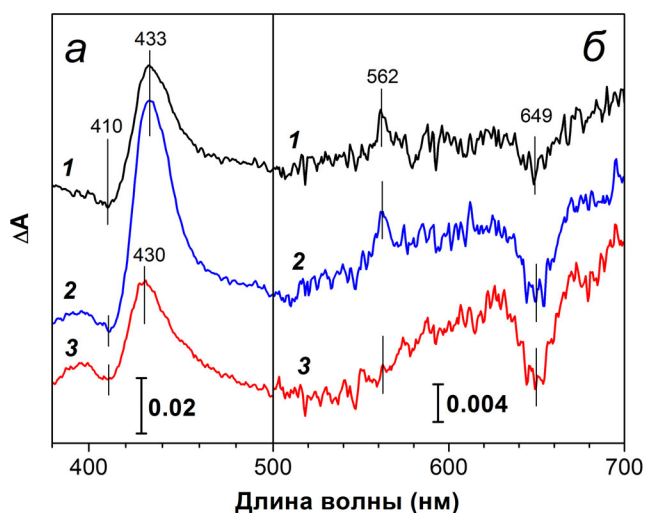


Рис. 4. Спектральные изменения связанного с мембраной цитохрома *bd-I* *E. coli* в полосе *Soret* (а) и видимой области (б), вызываемые цианидом в присутствии окислителей. Представлены разностные спектры поглощения бактериальных мембран, содержащих цитохром *bd-I* (обработанные KCN минус прединкубированные с 40 мкМ феррицинием и 0,2 мМ персульфатом аммония в течение 20 мин), записанные через 5 с (1), 5 мин (2) и 70 мин (3) после добавления 50 мМ цианида. Концентрация цитохрома *bd-I* – 1,8 мкМ. Остальные условия – как на рис. 1

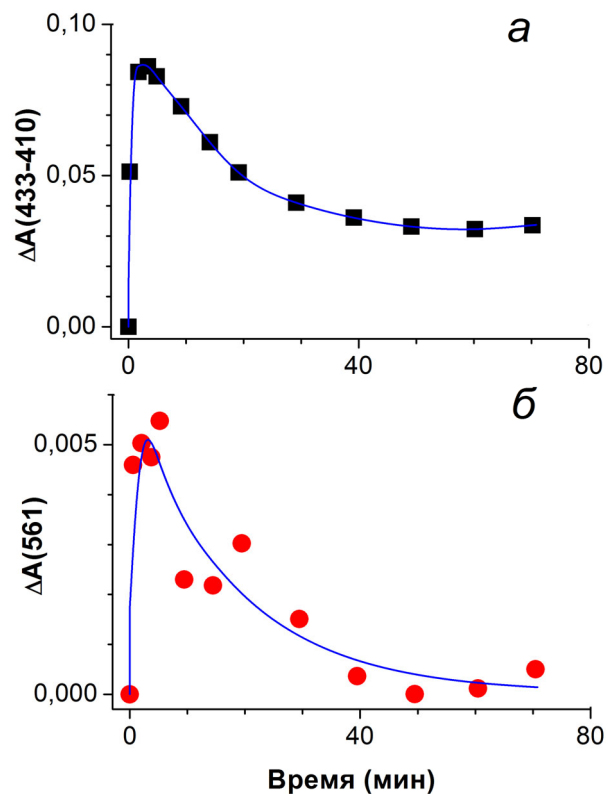


Рис. 5. Кинетика изменений поглощения в *Soret* (а) и при 561 нм (б), вызываемых добавлением 50 мМ KCN к прединкубированным с окислителями цитохром *bd-I*-содержащим мембранам *E. coli*. Условия – те же, что и на рис. 4. В случае (б) изменение поглощения при 561 нм определяли относительно опорной линии, соединяющей точки разностного спектра при 550 и 570 нм

окислением с помощью окислителей. Как и в отсутствие окислителей, вызванное цианидом развитие провала при 649 нм, вероятно, свидетельствует о распаде оксикомплекса и связывании лиганда с гемом *d*. Относительно небольшая величина разностного спектра *Soret* после завершения изменений (спектр 3 на рис. 4) указывает на реакцию цианида преимущественно с гемом *d*.

После изолирования фермента либо простой обработки нативных мембран детергентом цианид, помимо гема *d*, начинает реагировать с частью гема *b*. Это выражается в значительном длинноволновом сдвиге γ -полосы ($\lambda_{\text{max}} = 430\text{--}435 \text{ нм}$, $\lambda_{\text{min}} = 408\text{--}414 \text{ нм}$) в разностном спектре поглощения, вызванном 50 мМ KCN (рис. 2, а). Эти индуцированные цианидом спектральные изменения в полосе *Soret* напоминают таковые выделенных бактериальных мембран в отсутствие окислителей. Однако в случае изолированного фермента и мембран, обработанных детергентом, эти изменения не обращаются окислителями и пик при 562 нм отсутствует (рис. 2). Это говорит о том, что дополнительные (по сравнению с ко-

нечным ответом в Соре для мембран в присутствии феррициния и персульфата, спектр 3 на рис. 4) изменения поглощения в γ -полосе обусловлены взаимодействием цианида с фракцией гема *b*, а не восстановлением гема *b*. Такое объяснение согласуется с результатами исследования МКД [64], которое продемонстрировало, что в реакции изолированного полностью окисленного цитохрома *bd-I* с 50 мМ KCN фракция гема *b*, реагирующего с лигандом, принадлежит низкоспиновому гему b_{558} . Как и в случае нативных мембран, цианид, добавленный к изолированному ферменту или обработанным детергентом мембранам в отсутствие окислителей, вызывает исчезновение интенсивной полосы при 649 нм (рис. 2, б), что указывает на распад оксикомплекса и связывание лиганда с гемом *d*. Прединкубация солюбилизованного цитохрома *bd-I* с VCl_4 либо феррицинием с персульфатом приводит к образованию полностью окисленной формы оксидазы [80]. Добавление 50 мМ KCN к изолированному ферменту или обработанным детергентом мембранам в присутствии липофильных окислителей вызывает изменения в районе α -полосы гема *d*. Основной особенностью является увеличение поглощения ~ 623 нм, что можно приписать образованию комплекса окисленного гема *d* с цианидом (рис. 2, б).

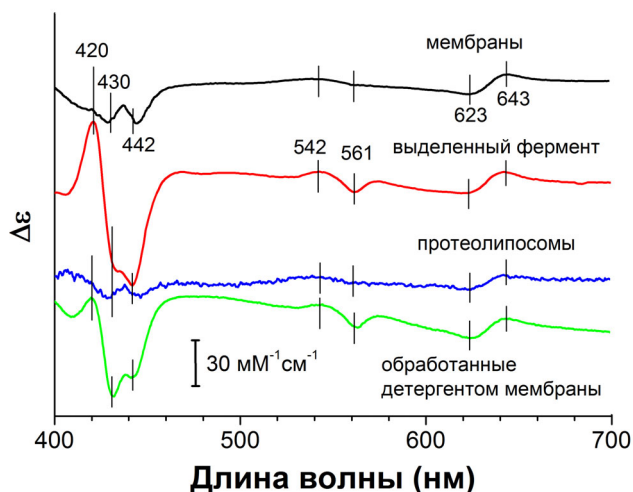


Рис. 6. Спектральные изменения разных форм цитохрома *bd-I* *E. coli*, вызываемые СО. Представлены разностные (обработанные 1 мМ СО, восстановленные дитионитом минус восстановленные дитионитом) спектры поглощения нативных бактериальных мембран, содержащих цитохром *bd-I*; изолированного солюбилизованного фермента; цитохрома *bd-I*, встроенного в искусственные липосомы; и цитохром *bd-I*-содержащих бактериальных мембран после обработки детергентом SB-12. Образцы восстанавливали избытком дитионита натрия. Газ СО в анаэробных условиях пропускали через раствор цитохрома *bd-I*, восстановленного дитионитом, в течение 5 мин при 1 атм. Состав среды как на рис. 2

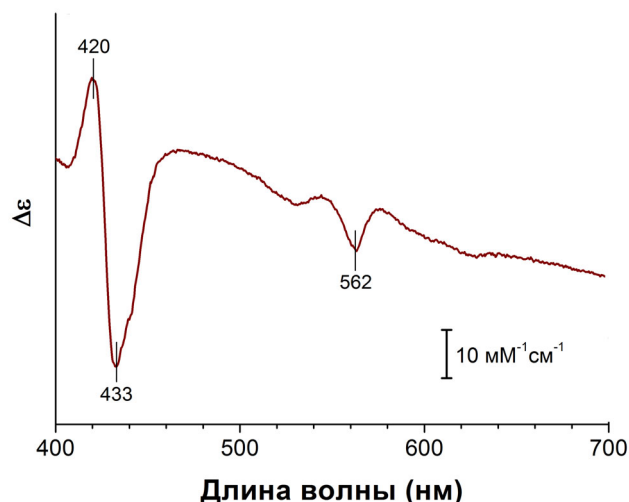


Рис. 7. Разность между индуцированными СО спектрами поглощения нативных и обработанных детергентом цитохром *bd-I*-содержащих мембран *E. coli*, восстановленных дитионитом. Двойной разностный спектр: разностный спектр обработанных детергентом СО-ферро мембран минус разностный спектр нативных СО-ферро мембран. Спектры, использованные для вычитания, взяты из рис. 6

Встраивание изолированного фермента в искусственные фосфолипидные мембраны (азолектиновые липосомы) восстанавливает реакционную способность лиганда, характерную для цитохрома *bd-I* в бактериальных мембранах: цианид больше не связывается с гемом b_{558} , взаимодействуя, в основном, с гемом *d*. Об этом свидетельствует небольшая величина разностного спектра поглощения в области Соре, индуцированного лигандом (рис. 2, б), аналогично тому, что наблюдается для нативных мембран, прединкубированных с окислителями (спектр 3 на рис. 4).

Взаимодействие цитохрома *bd-I* *E. coli* с окисью углерода. Похожие результаты были получены при изучении взаимодействия различных форм цитохрома *bd-I* с СО. Для всех форм восстановленного дитионитом цитохрома *bd-I* добавление СО приводит к появлению в видимой области разностного спектра поглощения полосы с максимумом при 643 нм и минимумом при 623 нм, а также широкой полосы с максимумом при 542 нм (рис. 6). Это типично для взаимодействия лиганда с восстановленным гемом *d*. Длинноволновый сдвиг полосы поглощения при 628 нм, вероятно, объясняется появлением α -полосы комплекса гема d^{2+} с СО [64]. Полосу поглощения при 542 нм можно отнести к β -полосе аддукта гема d^{2+} с СО либо к части его расщепленной α -полосы [69].

Добавление СО к нативным мембранам *E. coli* вызывает сложный W-образный ответ в области Соре разностного спектра поглощения

(рис. 6). Его амплитуда близка к таковой, индуцированной СО в районе α -полосы гема *d* (рис. 6). Необычный W-образный провал объясняют образованием комплекса гема d^{2+} с СО, сопровождающимся пертурбацией γ -полосы поглощения восстановленного гема b_{595} [67].

При выделении цитохром *bd-I* лишается своего естественного окружения, переходя в мицеллы анионного детергента *N*-лаурилсаркозинат натрия. В результате появляется фракция гема *b*, способного реагировать с СО. То же самое наблюдается и при простой обработке нативных мембран цвиттергентом SB-12 (рис. 6). Дополнительные изменения поглощения, вызванные сольubilизацией цитохрома и свидетельствующие о вовлечении гема *b*, проявляются в виде коротковолнового сдвига полосы *Soret* с $\lambda_{\max} = 420$ нм и $\lambda_{\min} = 433$ нм, а также провала при 562 нм в видимой области (рис. 7). В полном соответствии с этими данными, результаты ранее проведенного исследования МКД [64] показали, что СО в концентрации 1 мМ начинает взаимодействовать с частью низкоспинового гема b_{558} в изолированном полностью восстановленном цитохроме *bd-I*.

Как и в случае цианида, встраивание изолированного фермента в азолектиновые липосомы восстанавливает его СО-связывающие свойства близко к таковым мембранно-связанного цитохрома *bd-I*, т.е. в протеолипосомах гем b_{558} больше не связывает этот лиганд (рис. 6).

Появление в сольubilизированном цитохроме *bd-I* фракции гема b_{558} , способной к связыванию лигандов, могло бы быть вызвано негативным воздействием на фермент детергента SB-12. В таком случае наблюдаемые изменения взаимодействия фермента с лигандами в присутствии другого детергента — *N*-лаурилсаркозината, могли бы объясняться тем, что обмен детергентов (SB-12 на *N*-лаурилсаркозинат) в выделенном белке произошел не полностью. Однако связывание лиганда с частью гема b_{558} наблюдается и после обработки мембран додецил- β -D-мальтозидом (дополнительный рис. 1, см. Приложение к статье). Об этом свидетельствует тот факт, что добавочные спектральные изменения, вызываемые додецил- β -D-мальтозидом (дополнительный рис. 1), похожи на таковые, регистрируемые при сольubilизации мембран SB-12 (рис. 6, рис. 7). Результат эксперимента с додецил- β -D-мальтозидом представляется весьма весомым аргументом в пользу того, что наблюдаемые изменения взаимодействия оксидазы с лигандами действительно происходят вследствие перевода изучаемого белка в детергентные мицеллы, а не обусловлены специфическими повреждающими свойствами детергента SB-12.

Почему гексакоординированный низкоспиновый гем b_{558} может взаимодействовать с экзогенным лигандом. Гем b_{558} является гексакоординированным низкоспиновым с His-186 и Met-393 субъединицы CytA в качестве эндогенных аксиальных лигандов [45, 46, 59–61]. По этой причине гемовое железо, по-видимому, не имеет вакантной координационной позиции для реакции с лигандом. Однако предполагается, что сольubilизация цитохрома *bd-I* может привести к ослаблению связи Met-393 с железом. В результате 6-й аксиальный лиганд может быть замещен более сильным экзогенным лигандом, таким как цианид или СО. Это неудивительно для растворимых цитохромов, имеющих гистидин-метиониновую аксиальную лигандную структуру. Например, в условиях, которые могут дестабилизировать связь Met с гемовым железом, феррицитохром *c* связывает цианид [95, 96], а ферроцитохром *c* — СО [97, 98]. В этой работе впервые были получены данные, свидетельствующие о том, что встраивание цитохрома *bd-I* в искусственные фосфолипидные мембраны может стабилизировать связь между 6-м аксиальным лигандом Met-393 и железом гема b_{558} , возвращая его лиганд-связывающие свойства к таковым нативных мембран: как цианид, так и СО перестают связываться с гемом b_{558} и взаимодействуют, в основном, с гемом *d*. Различия в реакционной способности гема b_{558} по отношению к экзогенным лигандам между мембранно-связанной и изолированной сольubilизированной формами цитохрома *bd-I* необходимо учитывать при интерпретации данных спектроскопии по лиганд-связывающему поведению оксидазы.

Суммируя вышеизложенное, отметим, что были впервые представлены данные о том, что мембранное окружение может модулировать лиганд-связывающие свойства терминальной оксидазы типа *bd*. В нативных мембранах цианид и СО реагируют, в основном, с гемом *d*. При сольubilизации оксидазы экзогенные лиганды приобретают способность взаимодействовать также с частью гема b_{558} . Встраивание изолированного сольubilизированного фермента в азолектиновые липосомы восстанавливает лиганд-связывающий паттерн, близкий к наблюдаемому в интактных бактериальных мембранах: как цианид, так и СО больше не взаимодействуют с гемом b_{558} . Значительные изменения поглощения в полосе *Soret*, вызванные добавлением цианида к нативным мембранам, скорее всего, являются результатом восстановления гемов b_{558} и b_{595} эндогенным донором электронов, а не связывания лиганда с гемом типа *b*.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант 19-14-00063).

Благодарности. Автор признателен В.П. Скулачеву за интерес к работе и полезное обсуждение, И.А. Смирновой за помощь на начальной стадии экспериментов и ряд ценных советов, а также Р.Б. Гённису за штамм *E. coli* GO105/pTK1. Автор также хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность А.А. Константинову (скончался 1 мая 2020 г.), который вдохновил автора на выполнение этой работы.

Конфликт интересов. Автор заявляет, что у него нет конфликта интересов.

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

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 85, вып. 12, 2020.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffre, A., and Poole, R. K. (2020) Bacterial oxidases of the cytochrome *bd* family: Redox enzymes of unique structure, function and utility as drug targets, *Antioxid. Redox Signal.*, doi: 10.1089/ars.2020.8039.
- Azarkina, N., Borisov, V., and Konstantinov, A. A. (1997) Spontaneous spectral changes of the reduced cytochrome *bd*, *FEBS Lett.*, **416**, 171-174, doi: 10.1016/S0014-5793(97)01196-4.
- 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.
- 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.bbabi.2011.06.016.
- Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
- Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
- 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.
- 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.
- 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.
- Pereira, M. M., Gomes, C. M., and Teixeira, M. (2002) Plasticity of proton pathways in haem-copper oxygen reductases, *FEBS Lett.*, **522**, 14-18, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02920-4.
- Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
- Papa, S., Capitanio, G., and Papa, F. (2018) The mechanism of coupling between oxido-reduction and proton translocation in respiratory chain enzymes, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, **93**, 322-349, doi: 10.1111/brv.12347.
- 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.
- Borisov, V. B., and Siletsky, S. A. (2019) Features of organization and mechanism of catalysis of two families of terminal oxidases: heme-copper and *bd*-type, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1390-1402, doi: 10.1134/S0006297919110130.
- Borisov, V. B. (2002) Defects in mitochondrial respiratory complexes III and IV, and human pathologies, *Mol. Aspects Med.*, **23**, 385-412, doi: 10.1016/s0098-2997(02)00013-4.
- Borisov, V. B. (2004) Mutations in respiratory chain complexes and human diseases, *Ital. J. Biochem.*, **53**, 34-40.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
- 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.
- Wikstrom, M., Morgan, J. E., and Verkhovsky, M. I. (1997) Proton and electrical charge translocation by cytochrome *c*-oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 299-306, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00152-1.
- 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.
- 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.
- 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.
25. Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., and Gunsalus, R. P. (1990) Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product, *J. Bacteriol.*, **172**, 6333-6338, doi: 10.1128/jb.172.11.6333-6338.1990.
 26. Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., and Teixeira de Mattos, M. J. (2003) Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions, *J. Bacteriol.*, **185**, 204-209, doi: 10.1128/jb.185.1.204-209.2003.
 27. 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.
 28. 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.
 29. 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.
 30. 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.bbabi.2014.01.016.
 31. 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.
 32. 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 Cu₂-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, **580**, 4823-4826, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.072.
 33. 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.
 34. Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K., and Cooper, C. E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
 35. 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.
 36. 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.bbabi.2014.10.006.
 37. Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., et al. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
 38. 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.
 39. 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.
 40. 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.
 41. 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.
 42. 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**, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
 43. Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoeser, J., Friedrich, T., Bald, D., and de Vries, S. (2016) Cytochrome *bd* displays significant quinol peroxidase activity, *Sci. Rep.*, **6**, 27631, doi: 10.1038/srep27631.
 44. Forte, E., Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Petrosino, M., and Giuffre, A. (2019) In the respiratory chain of *Escherichia coli* cytochromes *bd*-I and *bd*-II are more sensitive to carbon monoxide inhibition than cytochrome *bo*₃, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 148088, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148088.
 45. Safarian, S., Hahn, A., Mills, D. J., Radloff, M., Eisinger, M., et al. (2019) Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases, *Science*, **366**, 100-104, doi: 10.1126/science.aay0967.
 46. Thesseling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., Muller, R., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
 47. Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1983) The purification and characterization of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9159-9165.
 48. Kita, K., Konishi, K., and Anraku, Y. (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome *b*₅₅₈-*d* complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron-carrying systems, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3375-3381.
 49. Sakamoto, J., Matsumoto, A., Oobuchi, K., and Sone, N. (1996) Cytochrome *bd*-type quinol oxidase in a mutant of *Bacillus stearothermophilus* deficient in *caa*₃-type cytochrome *c* oxidase, *FEMS Microbiol. Lett.*, **143**, 151-158, doi: 10.1016/0378-1097(96)00312-6.
 50. Sun, Y. H., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., Roux, C. M., Rolan, H. G., and Tsolis, R. M. (2012) The small protein CydX is required for function of cytochrome *bd* oxidase in *Brucella abortus*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, **2**, 47, doi: 10.3389/fcimb.2012.00047.
 51. VanOrsdel, C. E., Bhatt, S., Allen, R. J., Brenner, E. P., Hobson, J. J., et al. (2013) The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome *bd* oxidase complex and is required for cytochrome *bd* oxidase activity, *J. Bacteriol.*, **195**, 3640-3650, doi: 10.1128/JB.00324-13.
 52. 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.
 53. Chen, H., Luo, Q., Yin, J., Gao, T., and Gao, H. (2015) Evidence for requirement of CydX in function but not

- assembly of the cytochrome *bd* oxidase in *Shewanella oneidensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 318-328, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.005.
54. Hobson, J. J., Gallegos, A. S., Atha, B. W., 3rd, Kelly, J. P., Lein, C. D., VanOrsdel, C. E., Weldon, J. E., and Hemm, M. R. (2018) Investigation of amino acid specificity in the CydX small protein shows sequence plasticity at the functional level, *PLoS One*, **13**, e0198699, doi: 10.1371/journal.pone.0198699.
 55. Duc, K. M., Kang, B. G., Lee, C., Park, H. J., Park, Y. M., Joung, Y. H., and Bang, I. S. (2019) The small protein CydX is required for cytochrome *bd* quinol oxidase stability and function in *Salmonella enterica* serovar typhimurium: a phenotypic study, *J. Bacteriol.*, doi: 10.1128/JB.00348-19.
 56. 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.bbabi.2012.06.009.
 57. Goojani, H. G., Konings, J., Hakvoort, H., Hong, S., Gennis, R. B., Sakamoto, J., Lill, H., and Bald, D. (2020) The carboxy-terminal insert in the Q-loop is needed for functionality of *Escherichia coli* cytochrome *bd*-I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1861**, 148175, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148175.
 58. Thesseling, A., Burschel, S., Wohlwend, D., and Friedrich, T. (2020) The long Q-loop of *Escherichia coli* cytochrome *bd* oxidase is required for assembly and structural integrity, *FEBS Lett.*, in press, doi: 10.1002/1873-3468.13749.
 59. Fang, H., Lin, R.-J., and Gennis, R. B. (1989) Location of heme axial ligands in the cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli* determined by site-directed mutagenesis, *J. Biol. Chem.*, **264**, 8026-8032.
 60. Spinner, F., Cheesman, M. R., Thomson, A. J., Kaysser, T., Gennis, R. B., Peng, Q., and Peterson, J. (1995) The haem *b*₅₅₈ component of the cytochrome *bd* quinol oxidase complex from *Escherichia coli* has histidine-methionine axial ligation, *Biochem. J.*, **308**, 641-644, doi: 10.1042/bj3080641.
 61. Kaysser, T. M., Ghaim, J. B., Georgiou, C., and Gennis, R. B. (1995) Methionine-393 is an axial ligand of the heme *b*₅₅₈ component of the cytochrome *bd* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **34**, 13491-13501, doi: 10.1021/bi00041a029.
 62. Hill, J. J., Alben, J. O., and Gennis, R. B. (1993) Spectroscopic evidence for a heme-heme binuclear center in the cytochrome *bd* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 5863-5867.
 63. Tsubaki, M., Hori, H., Mogi, T., and Anraku, Y. (1995) Cyanide-binding site of *bd*-type ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **270**, 28565-28569, doi: 10.1074/jbc.270.48.28565.
 64. 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.
 65. Vos, M. H., Borisov, V. B., Liebl, U., Martin, J. L., and Konstantinov, A. A. (2000) Femtosecond resolution of ligand-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.
 66. 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 *b*₅₉₅ reacts with CO, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22095-22099, doi: 10.1074/jbc.M011542200.
 67. 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.
 68. 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 oxygen-reducing site of *bd*-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes *d* and *b*₅₉₅ is 10 Å, *Biochemistry*, **47**, 1752-1759, doi: 10.1021/bi701884g.
 69. 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.
 70. Bloch, D. A., Borisov, V. B., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2009) Heme/heme redox interaction and resolution of individual optical absorption spectra of the hemes in cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1246-1253, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.05.003.
 71. 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.bbabi.2010.05.010.
 72. 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.
 73. Siletsky, S. A., Zaspas, A. A., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2014) Microsecond time-resolved absorption spectroscopy used to study CO compounds of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **9**, e95617, doi: 10.1371/journal.pone.0095617.
 74. Siletsky, S. A., Rappaport, F., Poole, R. K., and Borisov, V. B. (2016) Evidence for fast electron transfer between the high-spin haems in cytochrome *bd*-I from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **11**, e0155186, doi: 10.1371/journal.pone.0155186.
 75. 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.
 76. 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.
 77. 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.
 78. Poole, R. K., Kumar, C., Salmon, I., and Chance, B. (1983) The 650 nm chromophore in *Escherichia coli* is an "Oxy-" or oxygenated compound, not the oxidized form of cytochrome oxidase *d*: A hypothesis, *J. Gen. Microbiol.*, **129**, 1335-1344, doi: 10.1099/00221287-129-5-1335.
 79. Kahlow, M. A., Loehr, T. M., Zuberi, T. M., and Gennis, R. B. (1993) The oxygenated complex of cytochrome *d* terminal oxidase: direct evidence for Fe-O₂ coordination in a chlorin-containing enzyme by Resonance Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5845-5846, doi: 10.1021/ja00066a071.
 80. 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.
81. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.007
 82. Lorence, R. M., Miller, M. J., Borochoy, A., Faiman-Weinberg, R., and Gennis, R. B. (1984) Effects of pH and detergent on the kinetic and electrochemical properties of the purified cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **790**, 148-153, doi: 10.1016/0167-4838(84)90218-8.
 83. Cournia, Z., Allen, T. W., Andricioaei, I., Antonny, B., Baum, D., et al. (2015) Membrane protein structure, function, and dynamics: a perspective from experiments and theory, *J. Membr. Biol.*, **248**, 611-640, doi: 10.1007/s00232-015-9802-0.
 84. Corradi, V., Sejdiu, B. I., Mesa-Galoso, H., Abdizadeh, H., Noskov, S. Y., Marrink, S. J., and Tieleman, D. P. (2019) Emerging diversity in lipid-protein interactions, *Chem. Rev.*, **119**, 5775-5848, doi: 10.1021/acs.chemrev.8b00451.
 85. Gu, R. X., and de Groot, B. L. (2020) Lipid-protein interactions modulate the conformational equilibrium of a potassium channel, *Nat. Commun.*, **11**, 2162, doi: 10.1038/s41467-020-15741-8.
 86. Koshy, C., and Ziegler, C. (2015) Structural insights into functional lipid-protein interactions in secondary transporters, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 476-487, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.05.010.
 87. Andreev, I. M., and Konstantinov, A. A. (1983) Reaction of oxidized cytochrome oxidase with cyanide. Effects of pH, cytochrome *c* and membrane environment, *Bioorg. Khim. (in Russian)*, **9**, 216-227.
 88. Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1986) Purification and reconstitution of the cytochrome *d* terminal oxidase complex from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol.*, **126**, 87-94, doi: 10.1016/s0076-6879(86)26011-5.
 89. Racker, E. (1972) Reconstitution of cytochrome oxidase vesicles and conferral of sensitivity to energy transfer inhibitors, *J. Membr. Biol.*, **10**, 221-235, doi: 10.1007/BF01867856.
 90. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275.
 91. Pudek, M. R., and Bragg, P. D. (1974) Inhibition by cyanide of the respiratory chain oxidases of *Escherichia coli*, *Arch. Biochem. Biophys.*, **164**, 682-693, doi: 10.1016/0003-9861(74)90081-2.
 92. Kauffman, H. F., and Van Gelder, B. F. (1973) The respiratory chain of *Azotobacter vinelandii*. II. The effect of cyanide on cytochrome *d*, *Biochim. Biophys. Acta*, **314**, 276-283, doi: 10.1016/0005-2728(73)90112-6.
 93. Koland, J. G., Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1984) Potentiometric analysis of the purified cytochrome *d* terminal oxidase complex from *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **23**, 1051-1056, doi: 10.1021/bi00301a003.
 94. Lorence, R. M., Koland, J. G., and Gennis, R. B. (1986) Coulometric and spectroscopic analysis of the purified cytochrome *d* complex of *Escherichia coli*: evidence for the identification of "cytochrome *a*₁" as cytochrome *b*₅₉₅, *Biochemistry*, **25**, 2314-2321, doi: 10.1021/bi00357a003.
 95. George, P., and Tsou, C. L. (1952) Reaction between hydrocyanic acid, cyanide ion and ferricytochrome *c*, *Biochem. J.*, **50**, 440-448, doi: 10.1042/bj0500440.
 96. Varhac, R., Tomaskova, N., Fabian, M., and Sedlak, E. (2009) Kinetics of cyanide binding as a probe of local stability/flexibility of cytochrome *c*, *Biophys. Chem.*, **144**, 21-26, doi: 10.1016/j.bpc.2009.06.001.
 97. Ben-Gershom, E. (1961) Use of carbon monoxide for detecting denaturation in haemoproteins, *Biochem. J.*, **78**, 218-223, doi: 10.1042/bj0780218.
 98. George, P., and Schejter, A. (1964) The reactivity of ferrocyanide with iron-binding ligands, *J. Biol. Chem.*, **239**, 1504-1508.

EFFECT OF MEMBRANE ENVIRONMENT ON LIGAND-BINDING PROPERTIES OF THE TERMINAL OXIDASE CYTOCHROME *bd*-I FROM *Escherichia coli*

V. B. Borisov*

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

Received July 10, 2020
Revised September 5, 2020
Accepted September 5, 2020

Cytochrome *bd*-I is a terminal oxidase of the *Escherichia coli* respiratory chain. This integral membrane protein contains three redox-active prosthetic groups (hemes *b*₅₅₈, *b*₅₉₅, and *d*) and couples the electron transfer from quinol to molecular oxygen to the generation of proton motive force, as one of its important physiological functions. The study was aimed at examining the effect of the membrane environment on the ligand-binding properties of cytochrome *bd*-I by absorption spectroscopy. The membrane environment was found to modulate the ligand-binding characteristics of the hemoprotein in both oxidized and reduced states. Absorption changes upon the addition of exogenous ligands, such as cyanide or carbon monoxide (CO), to the detergent-solubilized enzyme were much more significant and heterogeneous than those observed with the membrane-bound enzyme. In the native membranes, both cyanide and CO interacted mainly with heme *d*. An additional ligand-binding site (heme *b*₅₅₈) appeared in the isolated enzyme, as was evidenced by more pronounced changes in the absorption in the Soret band. This additional reactivity could also be detected after treatment of *E. coli* membranes with a detergent. The observed effect did not result from the enzyme denaturation, since reconstitution of the isolated enzyme into azolectin liposomes restored the ligand-binding pattern close to that observed for the intact membranes.

Keywords: cytochrome, terminal oxidase, respiratory chain, heme, membrane environment, ligand binding, *Escherichia coli*