

УДК 577.121.7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ЦИТОХРОМОВ *Bacillus subtilis* НА 2020 ГОД

Обзор

© 2021 Л. Хедерштедт

The Microbiology Group, Department of Biology, Lund University,
22362 Lund, Sweden; E-mail: Lars.Hederstedt@biol.lu.se

Поступила в редакцию 09.09.2020

После доработки 01.11.2020

Принята к публикации 01.11.2020

Bacillus subtilis служит моделью грамположительной бактерии и экспериментальной системой для исследования дыхательных ферментов. В настоящем обзоре представлены гемовые белки, известные в настоящее время для хорошо охарактеризованного лабораторного штамма *B. subtilis* 168. В обзоре основное внимание уделяется достижениям в исследованиях, проведенных за последние три десятилетия, в отношении функции и состава комплекса цитохрома *bc*, терминальных оксидаз и сукцинат:менахинон-оксидоредуктазы. Аэробная дыхательная система штамма 168 является типичной для вида *B. subtilis*, как определено по цитохромному составу неодомащенного штамма *B. subtilis* NCIB 3610 и ряду сконструированных цитохром-дефицитных мутантов этого штамма. В обзоре освещены необъяснённые и нерешённые проблемы молекулярной биологии цитохромов дыхательной цепи *B. subtilis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, грамположительные бактерии, оксидоредуктазы, сукцинатдегидрогеназа, NCIB 3610, цитохромы, *Bacillus*.

DOI: 10.31857/S0320972521010024

ВВЕДЕНИЕ

Bacillus subtilis, *Escherichia coli* и *Saccharomyces cerevisiae* (пекарские дрожжи) являются экспериментально наиболее детально изученными микроорганизмами. Эти организмы и их клеточные компоненты служат моделями для обсуждения и понимания физиологии клетки других микробов на молекулярном уровне и даже, в перспективе, у макроорганизмов. *B. subtilis* — это преимущественно аэробный организм, в отличие от *E. coli* и дрожжей, хотя он также может дышать, используя нитраты. На основе недавних открытий как в случае лабораторного штамма 168, так и неодомащенного штамма NCIB 3610 возникает вопрос, может ли *B. subtilis* вообще расти в условиях строгой аноксии [1]. Особенностью видов *Bacillus* среди бактерий является то, что отдельные клетки могут превратиться в эндоспору, которая является спящей живой клеткой, чрезвычайно устойчивой к теплу, химическим веществам и высыха-

нию и способной выживать в течение чрезвычайно длительных периодов времени [2].

Последние обзоры молекулярных аспектов цитохромов *B. subtilis* были опубликованы два–три десятилетия назад в виде главы книги и журнала соответственно [3, 4]. Целью данного обзора является освещение текущего состояния знаний и указание на оставшиеся пробелы в понимании данной темы. Штамм *B. subtilis* 168 содержит гены для, по крайней мере, 25 различных гемовых белков (табл. 1). В этом обзоре рассматриваются восемь дыхательных цитохромов. Другие гемовые белки *B. subtilis*, например ферменты, связанные с цитохромом P-450, водорастворимые глобины и каталазы здесь не рассматриваются. База данных SubtiWiki [5] — отличный источник собранной информации о белках и генах *B. subtilis* и образцах их экспрессии.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ АЭРОБНЫХ КЛЕТОК *Bacillus subtilis*

Мембраны *B. subtilis* содержат менахинон-7, который восстанавливается несколькими различными связанными с мембраной дегидрогеназами, включая NADH-дегидрогеназу типа II, сукцинат:менахинон-оксидоредуктазу (SQR) и гли-

Принятые сокращения: HQNO — *n*-2-гептил-4-гидроксифинолин оксид; NSMP — питательная среда с фосфатом для спорообразования; ТВАВ — триптозный кровяной агар; ТМ — трансмембранный α -спиральный сегмент; TMPD — N,N,N',N'-тетраметил-*p*-фенилендиамин; SQR — сукцинат:менахинон-оксидоредуктаза; HCOs — гем-медные оксидоредуктазы.

Таблица 1. Гемовые белки *B. subtilis* 168

Гемовый белок	Функция	Содержание гема	Структурные гены
Дыхательные цитохромы			
Цитохром <i>aa</i> ₃	менахинол-оксидаза	2 гема А	<i>qoxABCD</i>
Цитохром <i>caa</i> ₃	цитохром <i>c</i> -оксидаза	2 гема А	<i>ctaCDEF</i>
Цитохром <i>bd</i> ^a	менахинол-оксидаза	1 гем С	<i>cydAB</i>
		2 гема В	
Цитохром <i>bc</i> -комплекс	менахинол:цитохром <i>c</i> -оксидоредуктаза	1 гем D	<i>qcrABC</i>
		2 гема В	
SQR (комплекс II)	сукцинат:менахинон-оксидоредуктаза	2 гема С	<i>sdhCAB</i>
Цитохром <i>c</i> -550	перенос электрона	2 гема В	<i>cccA</i>
Цитохром <i>c</i> -551	перенос электрона	1 гем С	<i>cccB</i>
Нитрат редуктаза	менахинол:нитрат-оксидоредуктаза	1 гем С	<i>narGHI</i>
Цитохромы P-450			
BioI	гидроксилаза жирных кислот, участвующая в синтезе биотина	2 гема В	<i>bioI</i>
CYP107J1	неизвестно	1 гем В	<i>cypA</i>
CYP134A1	синтез хелатора железа пулчерримина	1 гем В	<i>cypX</i>
CYP109B1	монооксигеназа	1 гем В	<i>yjiB</i>
CYP152A1	гидроксилирует миристиновую кислоту в присутствии H ₂ O ₂	1 гем В	<i>cypC</i>
CYP102A2	гидроксилаза жирной кислоты	1 гем В	<i>yetO</i>
CYP102A3	гидроксилаза жирной кислоты	1 гем В	<i>yrhJ</i>
CP107K1	поликетидгидроксилаза	1 гем В	<i>pksS</i>
Глобины			
Флавогемоглобин	предполагаемая NO диоксигеназа	1 гем В	<i>Hmp</i>
Усечённый гемоглобин	защита от NO, тиоловый редокс-гомеостаз	1 гем В	<i>yjbI</i>
ГемАТ	аэротактический преобразователь	1 гем В	<i>hemAT</i>
Каталазы			
Каталаза I	каталаза вегетативной клетки	1 гем В	<i>katA</i>
Каталаза II	стресс-индуцированная каталаза	1 гем D	<i>katE</i>
KatX	связанная с эндоспорой каталаза	1 гем В	<i>katX</i>
Другие гемовые белки			
ГемА синтаза	синтез гема А из гема О	1 гем В ^b	<i>ctaA</i>
NO синтаза	синтез NO из L-аргинина	1 гем В	<i>yfIM</i>

Примечания. ^a Цитохром *bb'*, соответствующий цитохрому *bd* с группой гема D, замененной гемом В, по-видимому, образуется у некоторых мутантов при выращивании их до низкой плотности клеток [56]. ^b Изолированный CtaA, продуцируемый в *E. coli*, содержит гем В, а при избыточном продуцировании в *B. subtilis* он может также содержать гем О и гем А [28].

церол-3-фосфатдегидрогеназу. Дыхательная система окисления менахинола в аэробных клетках разветвлена несколькими терминальными оксидазами, восстанавливающими молекулярный кислород до воды. Система включает ветвь цитохром *c*-оксидазы с менахинол-оксидазой цитохрома *bc* в качестве донора электронов для ци-

тохромы *caa*₃. Небольшие цитохромы *c*, *c*-550 или *c*-551, могут облегчать перенос электронов между цитохром *c*-доменом комплекса *bc* и цитохром *c*-доменом комплекса *caa*₃. Цитохром *aa*₃ и цитохром *bd* представляют собой терминальные оксидазы менахинола в дыхательной цепи. Обе цитохром *a*-содержащие оксидазы являются гем-мед-

ными оксидоредуктазами (HCOs) [6] семейства А со сходными структурами, которые помпируют из клеток протоны за счет энергии окислительно-восстановительных реакций. Цитохром *bd* по своей структуре представляет собой совершенно другой тип оксидазы: он не содержит меди и не помпирует протоны, но активность этой оксидазы также вносит вклад в образование трансмембранного электрохимического потенциала в бактериальной клетке. Генерация АТР как таковая, по-видимому, обычно не является лимитирующим процессом для экспоненциального роста *B. subtilis* в периодической культуре [7].

Активные цитохром *aa₃* или цитохром *bd* являются необходимым условием для аэробного роста клеток *B. subtilis* [8]. Цитохром *aa₃* является преобладающей оксидазой в различных условиях роста [8, 9], а недостаток этой оксидазы вызывает уменьшение потока метаболитов через цикл Кребса [7]. При низком давлении кислорода или пониженном соотношении NAD/NADH в клетке и у мутантов, дефицитных по цитохрому *aa₃*, индуцируется синтез цитохрома *bd* [10]. Цитохромы типа *bd* обладают высоким сродством к молекулярному кислороду и менее чувствительны к цианиду и другим соединениям, известным как ингибиторы HCOs [11]. Количество цитохром *c*-оксидазы в *B. subtilis* повышается на ранней стационарной фазе роста и подвержено сильной катаболитной репрессии, например, глюкозой в питательной среде. Мутанты, лишенные как цитохрома *aa₃*, так и *caa₃*, плохо спорулируют, однако соответствующие мутанты, дефектные по одной из оксидаз, продуцируют нормальное количество эндоспор [8]. Важность ветви цитохромов *bc-*caa₃** и цитохромов *c-550* и *c-551* для физиологии клеток *B. subtilis* в настоящее время не понятна. Цитохром *c* не важен ни для роста, ни для спорообразования, как показано при использовании мутантов с множественными делециями всех генов цитохрома *c* (*qcrC*, *ctaC*, *cccA* и *cccB*) [12], а также дефектных по генам *resABC*, необходимым для синтеза цитохрома *c* [13, 14]. Как представлено далее в этом обзоре, отсутствие фенотипического проявления у мутантов, дефектных в ветви цитохром *c*-оксидазы дыхательной системы, не связано с каким-то нераспознанным дефектом лабораторного штамма 168 *B. subtilis*, поскольку недомашненный штамм NCIB 3610, образующий био пленку, обнаруживает ту же особенность.

ЦИТОХРОМ *aa₃*

Недавно с помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура цитохрома *aa₃*

из *B. subtilis* с разрешением 3,6 Å [15]. Подтвердились предсказанные структурные особенности оксидазы, и появилась информация о сайтах связывания менахинона-7. Фермент состоит из четырех полипептидов: субъединица I (QoxV состоит из 649 а.о. и 15-ти трансмембранных α -спиральных сегментов (ТМ)), субъединица II (QoxA после обработки лидерной пептидазой II представляет собой липопротеин из 295 а.о. и 2-х ТМ), субъединица III (QoxC состоит из 204 а.о. и 5-ти ТМ) и субъединица IV (QoxD состоит из 124 а.о. и 3-х ТМ). Субъединица I содержит две молекулы гема А, гем *a* с низким спином и гем *a₃* с высоким спином, а также один атом меди Cu_B (табл. 2). Гем *a₃*- Cu_B является частью каталитического центра, где кислород восстанавливается до воды за счет электронов, переносимых при посредстве гема *a* из сайта окисления менахинола. Самый *N*-концевой ТМ субъединицы I, обозначенный ТМ0, уникален для менахинол-оксидаз по сравнению с цитохром *c*-оксидазами. Субъединица I имеет два дополнительных ТМ (ТМ13 и ТМ14) на *C*-конце, а субъединица III не имеет двух ТМ, по сравнению с соответствующими субъединицами классических цитохром *c*-оксидаз, таких как в митохондриях млекопитающих. ТМ13 и ТМ14 субъединицы I соответствуют первым двум ТМ субъединицы III в классических цитохром *c*-оксидазах, т.е. последовательности этих двух ТМ в ходе эволюции, по-видимому, мигрировали из субъединицы III в субъединицу I. Это событие отражает тот факт, что у большинства дышащих бактерий ген субъединицы III в хромосоме непосредственно следует за геном субъединицы I. Части ТМ0, ТМ1, ТМ2 и ТМ3 субъединицы I образуют полость, открытую для липидного бислоя и способную вмещать менахинон. Было показано, что аминокислотные остатки ТМ1 и ТМ2 взаимодействуют с семименахиноном и ингибитором *n*-2-гептил-4-гидроксихинолоноксидом (HQNO), который является миметиком семихинона. Низкие микромолярные концентрации HQNO подавляют менахинол-оксидазную активность цитохрома *aa₃* *B. subtilis* [15].

ВЕТЬ ЦИТОХРОМ *c*-ОКСИДАЗЫ

Цитохром *bc* и цитохром *caa₃* в *B. subtilis* образуют суперкомплекс, который может катализировать окисление менахинола и восстановление кислорода [16–18]. Этот комплекс, по-видимому, включает также цитохром *c-550* или цитохром *c-551*, как было определено с помощью двумерного электрофореза солюбилизован-

ных детергентами мембран с последующей масс-спектроскопией [18]. Суперкомплекс, вероятно, очень похож на таковой из *Mycobacterium smegmatis*, структура которого была определена двумя исследовательскими группами с помощью крио-ЭМ [19, 20]. Однако у микобактерий и других актинобактерий, таких как *Corynebacterium glutamicum*, комплекс *bc* несет два домена цитохрома *c*, в то время как оксидаза не содержит цитохрома *c*. В суперкомплексе, который катализирует эффективное менахинол-зависимое окисление без необходимости в экзогенном цитохроме *c*, цитохром *bc* представляет собой димер с примыкающей с каждой стороны оксидазой. В суперкомплексе *M. smegmatis* домен цитохрома *c*, QcrC, был обнаружен в различных конформациях, менахинон присутствовал как в Q_D, так и в Q_I сайтах, а субъединица III (CtaE) взаимодействовала с комплексом цитохрома *bc* через молекулу кардиолипина [20]. Вклад кардиолипина в стабилизацию цитохромного *bc*-*caa*₃ суперкомплекса можно наблюдать у *B. subtilis* в экспериментах с кардиолипин-дефицитными мутантами [21].

Комплекс цитохрома *bc* различных видов *Bacillus* и актинобактерий имеет общие черты с цитохромом *b₆f* хлоропластов и цианобактерий, а не с классическим комплексом *bc₁* (комплекс III) митохондрий и многих аэробных грамотрицательных бактерий [22]. Белок QcrA *B. subtilis* (167 а.о. и 1 ТМ) несет 2Fe2S железосерный кластер Rieske-типа. QcrB (224 а.о. и 4 ТМ) содержит две группы гексакоординированного низкоспинового гема В, гем *b_H* (также называемый *b_N* или *b_D*) и *b_L* (*b_P*), а также третий гем — *c_i* (или *c_n*, или *x*), который ковалентно связан тиоэфирной связью с одиночным цистеиновым остатком (Cys43 в *B. subtilis*) [23]. Этот Cys сохранён в цитохроме *b₆f* хлоропластов и цианобактерий [23].

Гемы *b_H* и *b_L* связаны, как в классических комплексах *bc₁*, с четырьмя аксиальными лигандами His на двух параллельных ТМ, чтобы обеспечивать трансмембранный перенос электронов. В отличие от канонического комплекса III и в соответствии с комплексами *b₆f*, в *bc*-комплексе *B. subtilis* C-концевые ТМ субъединицы, содержащие гем В, по всей видимости, мигрировали на N-конец QcrC. Гем *c_i* в QcrB расположен рядом с гемом *b_H* и сайтом восстановления менахинона близко к цитоплазматической стороне мембраны. Функция гема *c_i*, который является высокоспиновым и имеет относительно высокий окислительно-восстановительный (редокс) потенциал, остается загадкой. Можно предположить, что пара *b_H*-гем-*c_i*-гем образует альтернативный сайт связывания хинона в каче-

стве адаптации для восстановления менахинона в кислородных условиях, или что гем *c_i* участвует в циклическом переносе электрона [24]. Образование ковалентной связи гема *c_i* с полипептидом QcrB *B. subtilis* происходит независимо от ResABC цитохром *c*-синтезирующих белков [13], а для комплекса *b₆f*, как известно, требуется специальный механизм, называемый системой IV, который отсутствует в *B. subtilis* [25]. QcrC (255 а.о. и 3 ТМ) на C-конце несет домен цитохрома *c*, расположенный на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Этот цитохром *c* (*c*-553) имеет типичное аксиальное лигирование гемового железа с Met и His, но его аминокислотная последовательность отличается от других доменов цитохрома *c* в *B. subtilis* (CccA, CccB и CtaC) и от цитохрома *c_i* митохондрий.

Отсутствие комплекса цитохрома *bc* из-за делеции генов *qcr* или отсутствие гема *c_i* из-за замены Cys43 на Ser не дает наблюдаемого фенотипа у *B. subtilis* [22, 23]. Попытки сверхпродукции комплекса *bc* в *B. subtilis* за счет помещения оперона *qcrABC* в плазмиду привели только к двукратному увеличению содержания фермента [23]. Такой низкий выход может быть связан с ограниченным количеством факторов, необходимых для экспорта белка (ResA имеет сигнальный пептид с двойным аргинином) или для сборки субъединиц. Отсутствие достаточного экспериментального материала для биохимического анализа и фенотипа для дефектных мутантов серьезно затруднило исследования ферментов *B. subtilis*, поэтому биохимические данные небольшие (табл. 2).

Цитохром *c*-553 *bc*-комплекса предположительно достаточен для прямого переноса электронов на цитохром *c*-551 в комплексе цитохрома *caa*₃, но, как обсуждается далее в данном обзоре, цитохромы *c*-550 и *c*-551 могут опосредовать перенос электрона между двумя ферментами или взаимодействовать с другими компонентами клетки. Комплекс цитохрома *caa*₃ состоит из четырех субъединиц: CtaD (субъединица I, 622 а.о.), CtaC (субъединица II, липопротеин из 336 а.о.), CtaE (субъединица III, 207 а.о.) и CtaF (субъединица IV, 110 а.о.). Субъединица I содержит гем *a* и двуядерный центр гем *a₃*-Cu_B. Субъединица II имеет в C-концевой части на внешней стороне мембраны домен с двумя атомами меди в центре Cu_A, за которым следует домен цитохрома *c*-551. Структура цитохрома *caa*₃, вероятно, очень похожа на структуру цитохрома *aa₃* *M. smegmatis* [19, 20]. Гены оксидазы в хромосоме образуют кластер *ctaABCDEFGF*, где *ctaA* (кодирующий гем А-синтазу) транскрибируется с другой цепи ДНК. Ген *ctaG* кодирует

цитохром *caa*₃-специфичный фактор биосинтеза, по-видимому, необходимый для включения Cu_B в CtaD [26]. Множество дополнительных белков, кодируемых генами в других частях хромосомы, участвуют в биогенезе цитохрома *caa*₃: Lgt и LspA необходимы для модификации липопротеина CtaC (и других белков, таких как субъединица II цитохрома *aa*₃), белки ResABC и CcdA необходимы для синтеза цитохрома *c* [27], CtaA и CtaB – для синтеза гема А [28], Sco (YpmQ) [29] и CtaK [30] – для сборки CuA, CtaM важен для синтеза как цитохрома *caa*₃, так и *aa*₃ [30]. Факторы биогенеза цитохрома *caa*₃ в значительной степени были идентифицированы посредством скрининга мутантов, дефицитных по окислению N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамина (TMPD). В клетках *B. subtilis* эта активность строго зависит от активности цитохрома *caa*₃ [31]. Гем А в цитохроме *caa*₃ *Bacillus* PS3 и в цитохроме *aa*₃ *Bacillus cereus* может быть заменен гемом О [32, 33]. Неизвестно, может ли цитохром *aa*₃ или *caa*₃ *B. subtilis* включать гем О. Мутанты с заблокированным синтезом гема А (из-за отсутствия CtaA или из-за мутаций в этом белке) содержат гем О, но плохо растут, что указывает на дефектный цитохром *aa*₃, и имеют фенотип, не способный окислять TMPD, что указывает на дефектный цитохром *caa*₃ [34, 35].

ЦИТОХРОМЫ *c-550* и *c-551*

Все цитохромы *c* *B. subtilis* прочно связаны с мембраной. Цитохромы *c-550* (CccA, 120 а.о.) и *c-551* (CccB, липопrotein из 92 а.о.) имеют очень похожие домены цитохрома, но по-разному прикрепляются к внешней стороне цитоплазматической мембраны. CccA прикреплен с помощью одиночного ТМ, соответствующего нерасщепленной экспортной сигнальной последовательности белка [36, 37]. Липопrotein CccB удерживается в мембране диацилглицериновым фрагментом, присоединенным к N-концевому остатку Cys, таким образом, созревание *c-551* зависит от Lgt и LspA [38]. В близком ортологе, цитохроме *c-551* *Bacillus* PS3, N-концевой Cys заблокирован, предположительно ацетилирован, и две ацильные цепи представляют собой молекулы пальмитоила [39]. Последовательности доменов цитохрома *c*, CccA и CccB, подобны последовательности домена цитохрома *c* CtaC, но отличаются от последовательности QcrC и митохондриального цитохрома *c* [22, 36, 40]. Структура гомологичного домена цитохрома *c* *Bacillus pasteurii* при высоком (0,97 Å) разрешении показана в работе Benini et al. [41]. Ге-

ны, кодирующие CccA [36] и CccB [38] в хромосоме *B. subtilis*, не связаны с генами с известной функцией в дыхательной системе. Экспрессия гена *cccA* подавляется катаболитом [42]. Матричная РНК *cccA* является моноцистронной и имеет длительный период полураспада (15 мин) в клетке по сравнению с периодом полураспада для *cccB* (7 мин) и средним периодом полураспада (4 мин) для мРНК в *B. subtilis* [43].

Физиологическую роль (роли) двух малых цитохромов *c* еще предстоит установить. Обнаружено, что CccA и CccB связаны с суперкомплексом цитохром *bc*–цитохром *caa*₃ и, предположительно, способствуют переносу электронов в этом комплексе. Однако нельзя исключить, что малые цитохромы *c* опосредуют перенос электронов к или от другого компонента(ов) на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Не был обнаружен фенотип с недостатком или избытком цитохромов *c-550* или *c-551* у *B. subtilis*. Однако у *Bacillus anthracis*, который эволюционно близок к *B. subtilis* [44], экспрессия гена вирулентности нарушается, если отсутствуют как *c-550* (CccA), так и *c-551* (CccB) [45]. Этот эффект наблюдается также у мутантов с заблокированным синтезом цитохрома *c* и у мутантов, лишенных белка BAS3568 (ортолог YozB у *B. subtilis*), но не у мутантов, дефицитных по цитохромам *bc* или *caa*₃ или только по одному из малых цитохромов *c* [45]. Эти данные свидетельствуют о том, что функции *c-550* и *c-551* перекрываются в некоторых процессах, не зависящих от цитохром *c*-оксидазной ветви дыхательной системы. Механизм связи между экспрессией генов и наличием двух малых цитохромов *c* остается неизвестным.

Очень стабильный домен цитохрома *c* *B. Subtilis*, CccA [37], может использоваться в качестве красного маркера для визуализации и обнаружения мембранных белков, лишенных хромофора, и белков с функцией, которая неизвестна или трудна для анализа, например мембранных транспортных белков и шаперонов [46]. Кроме того, домен цитохрома *c*, CccA, можно использовать для исследования трансмембранной топологии белков, поскольку гемилирование с образованием ковалентно связанного гема может происходить только на внешней стороне цитоплазматической мембраны у бактерий (например, у *E. coli* и *B. subtilis*) из-за строгой зависимости от аппарата синтеза цитохрома *c* [27].

ЦИТОХРОМ *bd*

Цитохромы *bd*-типа встречаются только у бактерий, и они сильно отличаются от НСОs по

структуре и тем, что не зависят от меди и не являются протонными помпами [11, 47].

Они состоят из двух белковых субъединиц, CydA и CydB, и часто дополнительного небольшого полипептида (CydS, или CydX, или CydY, или CydZ). Как первоначально наблюдали Sakamoto et al. [48], существует два вида оксидазы типа цитохрома *bd*, которые различаются длиной так называемой Q-петли (соединяющей ТМ V и VI) в субъединице CydA. Цитохром *bd* *B. subtilis* и большинства других грамположительных бактерий имеет короткую Q-петлю. Как показывает рентгеноструктурный анализ структуры цитохрома *bd* грамположительной бактерии *Geobacillus thermodenitrificans* K1041 [49], CydA и CydB имеют по 8 ТМ и в целом являются очень похожими белками. Эта оксидаза также содержит небольшой трансмембранный спиральный белок CydS. CydA содержит все протетические группы: гем *b*-558 (гексакоординированный с аксиальными лигандами Met и His), гем *b*-595 (пентакоординированный с аксиальным лигандом Glu или гексакоординированный с аксиальными лигандами His и Glu [50]) и гем *d*. Три группы гемов расположены треугольником и находятся под действием сил Ван-дер-Ваальса. Электроны, получаемые при окислении менахинола с участием петли Q на внешней стороне мембраны, через гем *b*-558 переносятся на гем *d* и оттуда перераспределяются, чтобы также восстановить *b*-595 с целью проведения ферментом четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода с образованием воды. В каждом из CydA и CydB есть по одному каналу, по которому протоны могут переходить из цитоплазмы к участку фермента, где происходит восстановление кислорода, близко к внешней стороне мембраны [49].

Цитохром *bd* *B. subtilis* кодируется опероном *cydABCD* [51]. Как и у других бактерий, CydC и CydD не являются частью зрелой оксидазы, но необходимы для её биогенеза [8]. Эти интегральные мембранные белки обнаруживают сходство с транспортерами АТР-связывающего типа и, вероятно, функционируют как гетеродимер. Разностный спектр поглощения цитохрома *bd* *B. subtilis* (восстановленная минус окисленная формы цитохрома *bd*) в изолированных мембранах при комнатной температуре имеет максимумы при 563, 597 и 626 нм, а при 77 К – при 558, 563, 593 и 622 нм [51]. Из штаммов *B. subtilis* с повышенным примерно в четыре раза содержанием цитохрома *bd* [52] было выделено небольшое количество фермента. Неизвестно, содержит ли он в дополнение к CydAB небольшой белок, не обнаруживаемый с помощью

SDS-PAGE и путём окрашивания белков. Цитохром *bd* родственной бактерии *Geobacillus (Bacillus) stearothermophilus* K17, вероятно, содержит CydS, на что указывает ген *orf1*, следующий сразу за геном *cbdB* (для CydB), но это не было обнаружено при исходном биохимическом анализе выделенного фермента [48]. Мутанты *B. subtilis* с делецией по *cydABCD* могут быть функционально дополнены генами *cydABCD* *Enterococcus faecalis* [53], что указывает на то, что цитохром *bd* этих бактерий не содержит других белков, кроме CydA и CydB, или что дополнительные функционально важные малые субъединицы у *B. subtilis* и *E. faecalis* являются взаимозаменяемыми.

Экспрессия оперона *cydABCD* регулируется несколькими белками [10, 54]. Она подавляется, когда в среде роста присутствует нитрат [55], а также при связывании Rex, который определяет соотношение $NAD^+/NADH$ в клетке [56]. Когда это соотношение уменьшается, например в результате недостатка кислорода, индуцируется транскрипция оперона *cyd* и нескольких дополнительных генов [10]. Таким образом, содержание цитохрома *bd* оказывается высоким в клетках культур, выросших в среде с высокой плотностью клеток (где содержание кислорода низкое из-за высокой дыхательной активности клеток). Цитохром *bb'* наблюдается у мутантов, лишенных как цитохрома *aa₃*, так и SQR, когда клетки выращивают в условиях, приводящих к очень низкому содержанию цитохрома *bd* [57]. Предполагается, что цитохром *bb'* соответствует CydAB, содержащему три группы гема В (т.е. является цитохромом *bd* с гемом D, замещенным гемом В), или является оксидазой, структурные гены которой еще не идентифицированы [57]. Последняя возможность кажется маловероятной, поскольку гены *B. subtilis* детально изучены [58]. Что касается предпочтения сайта связывания гемом, то в цитохроме *bd* *G. thermodenitrificans*, по сравнению с цитохромом *bd*-I *E. coli*, позиции групп гема *b*-595 и гема *d* в CydA взаимозаменяемы [50, 59].

Оперон *ythABC* у *B. subtilis*, по-видимому, кодирует второй тип фермента цитохром *bd* с близким сходством последовательности с цитохромом *bd* *B. stearothermophilus* [48]. До сих пор нет доказательств того, что белки YthAB продуцируются, и нет фенотипа, который ассоциировался бы с мутантами с делецией по *ythAB* [8, 57]. Однако было показано, что мутант с двойной делецией *qoxABCD ythAB* продуцирует споры менее эффективно, чем дикий тип, однако некоторые одиночные мутанты споруют нормально [8].

СУКЦИНАТ:МЕНАХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА

SQR, также известный как сукцинатдегидрогеназа и комплекс II, является частью как цикла Кребса, так и дыхательной цепи. Фермент катализирует окисление сукцината до фумарата, сопряжённое с восстановлением менахинона. Он также может действовать в обратном направлении, чтобы синтезировать сукцинат из фумарата. Обзор исследований по SQR *B. subtilis* последний раз был опубликован в 2002 г. [60], а обзор исследований по SQR дигемного семейства, к которому принадлежит фермент *B. subtilis*, был опубликован в 2013 г. [61]. Обобщенные данные по генетике *sdhCAB B. subtilis*, кодирующего три белка SQR, можно найти в обзоре Hederstedt и Ohnishi [62].

B. subtilis SQR представляет собой гетеротример, состоящий из флавопротеина (SdhA) с ковалентно связанным FAD в соединении с $\delta\alpha$ -N(3)His железосерного белка (SdhB) с тремя железосерными кластерами (2Fe₂S, 3Fe₄S, 4Fe₄S) и интегрального мембранного цитохрома *b*-558 (SdhC) с 5 ТМ (I–V), содержащего две группы гема В (табл. 2). SdhA и SdhB связываются на цитоплазматической стороне мембраны с цитохромом *b*-558. Активный центр дикарбоксилата находится на SdhA, и электроны передаются от FAD через железосерные кластеры к гему цитохрома *b*-558, чтобы в конечном итоге восстановить менахинон. Две гемовые группы в цитохроме *b*-558, как и в субъединице цитохрома *b* комплекса *bc*, являясь низкоспиновыми координированными с бис-гистидинами и с плоскостями порфирина, ориентированными примерно перпендикулярно плоскости мембраны и расположенными так, чтобы обеспечить трансмембранный перенос электронов. Однако есть существенные различия между двумя типами дигемных, трансмембранных цитохромов [63]. В SQR *B. subtilis* четыре аксиальных лиганда His распределены по четырем ТМ [64], тогда как в комплексе *bc* они включают только два ТМ [61].

В SQR *B. subtilis* проксимальный гем (b_p , вблизи от мембранных периферических субъединиц А и В на цитоплазматической стороне мембраны) и дистальный гем (b_D , вблизи от внешней стороны мембраны) были определены, как гемы с высоким и низким окислительно-восстановительным потенциалом соответственно, с помощью методов сайт-специфических мутаций и спектроскопии [65, 66] (табл. 2). Гем b_p связан с His70 (ТМ-II) и His155 (ТМ-IV), тогда как гем b_D связан с His28 (ТМ-I) и His113 (ТМ-III). Измеряемый

окислительно-восстановительный потенциал гемов, спектры ЭПР и спектр поглощения видимого света незначительно различаются в зависимости от того, определены ли они для связанного с мембраной SQR, для фермента, выделенного с детергентом, или для цитохрома *b*-558 (SdhC), выделенного с детергентом [67]. Редокс-сопряжение между двумя гемами в SdhC и между гемом b_p и железосерными кластерами в SdhB в интактном SQR, а также взаимодействие с менахиноном и другими липидами, в случае мембранного фермента *B. subtilis*, вероятно, отражают наблюдаемые незначительные различия в свойствах. Как показало исследование связывания HQNO, рядом с гемом b_D существует сайт связывания менахинона [65, 68]. Основываясь на собранных данных [60], можно предположить, что имидазольная группа His28 (аксиальный лиганд гема b_D) и одна из пропионатных групп этого гема напрямую взаимодействуют с менахиноном, аналогично ситуации в нитратредуктазе *A. coli* [69]. Трансмембранный электрохимический градиент поддерживает термодинамически эндергонический («uphill») перенос электронов в SQR *B. subtilis* при окислении сукцината (+25 мВ) и переносе электронов через гем b_p (+65 мВ) на b_D (–95 мВ) для восстановления менахинона-7 (–74 мВ) [70]. То же происходит и у других бактерий, зависимых от хинонов с низким потенциалом при зависимом от сукцинатооксидазы дыхании [71–73].

Структура SQR *B. subtilis*, выведенная на основе множества биохимических и биофизических данных [60], соответствует недавно опубликованной крио-ЭМ структуре SQR *Mycobacterium smegmatis* (мембранный якорь содержит три полипептида SdhCDF) [74] и рентгеноструктурным данным для родственных дигемных фумаратредуктаз *Wolinella succinogenes* [61, 75] и *Desulfovibrio gigas* [76]. Место связывания менахинона было обнаружено рядом с гемом b_D как в структуре *M. smegmatis*, так и *D. gigas*, и активность мутантов первого фермента подтверждает мнение о том, что выявленный сайт связывания важен для восстановления менахинона. Попытки получить кристаллы SQR *B. subtilis* с хорошей дифракцией пока не увенчались успехом [77]. Недостающую информацию, такую как положение сайтов связывания менахинона и динамические изменения белка фермента в зависимости от субстратов и ингибиторов, можно было бы получить с помощью методологии крио-ЭМ. Для анализа методом ЯМР разработана методика получения цитохрома *b*-558 *B. subtilis* в *E. coli* с изотопной меткой [78].

Таблица 2. Биофизические свойства протетических групп гемсодержащих компонентов аэробной респираторной системы *B. subtilis*

Фермент или цитохром	Протетические группы ^a									Ссылки
	Центры с гемом				Железосерные кластеры		Центры с медью		Другие	
	Центр	E _m (mV)	EPR сигнал (g _{max})	α-полоса погл. макс. (nm)	Тип	E _m (mV)	Центр	EPR сигнал (g _{max})		
Цитохром <i>aa</i> ₃	гем <i>a</i>			601			Cu _B			[102, 103, 108]
	гем <i>a</i> ₃									
Цитохром <i>caa</i> ₃	гем <i>a</i>		3,00	605			Cu _A	2,178		[102, 104, 108]
	гем <i>a</i> ₃						Cu _B			
	гем <i>c</i>		3,46	551						
SQR	гем <i>b</i> _p	+65	3,68	558b	[2Fe2S]	+80			FAD _{cov}	[65, 67, 100]
	гем <i>b</i> _D	-95	3,42	558b	[3Fe4S] [4Fe4S]	-25 -240				
Цитохром <i>bc</i> -комплекс	гем <i>b</i> _H				[2Fe2S]					[22, 23, 105]
	гем <i>b</i> _L									
	гем <i>c</i> ₁									
	гем <i>c</i>	+250		553						
Цитохром <i>c</i> -550	гем <i>c</i>	+178	3,41	550 ^c						[37]
Цитохром <i>c</i> -551	гем <i>c</i>	> +100 ^d		551 ^e						[38]
Цитохром <i>bd</i>	гем <i>b</i> ₅₅₈			563						[51]
	гем <i>b</i> ₅₉₅			597						
	гем <i>d</i>			626						

Примечания. ^a Данные характеристики являются свойствами изолированного фермента или белкового домена. ^b При 77 К гем *b*_p имеет максимум поглощения при 558 нм, а гем *b*_D имеет двойной пик с максимумами при 553 и 558 нм. ^c При 77 К максимум поглощения приходится на 548 нм. ^d Цитохром *Bacillus* PS3 имеет среднеточечный потенциал +225 мВ [106]. ^e При 77 К максимум поглощения приходится на 547 нм.

ДЫХАТЕЛЬНАЯ НИТРАТРЕДУКТАЗА

Мембраносвязанная нитратредуктаза (NAR), кодируемая опероном *narGHJI* *B. subtilis*, катализирует окисление менахинола с восстановлением нитрата до нитрита [79, 80]. Считается, что NAR *B. subtilis* в основном функционирует в отсутствие кислорода. Фермент не был очищен и охарактеризован, но, судя по полипептидам, выведенным из геновой последовательности, очень похож на нитратредуктазу *A. E. coli*, структура которой известна [81], и подробная биохимическая информация о которой доступна [82]. Интегральная мембранная субъединица NarI представляет собой 5-ТМ цитохром с двумя гек-

сакоординированными группами гема *b*, гемами *b*_H и *b*_L, которые лигированы между остатками His на ТМ-II и ТМ-V, аналогично ситуации в QcrB комплекса цитохрома *bc*. NarI связывает на цитоплазматической стороне мембраны периферические субъединицы NarG и NarH. NarG несет группу бис-молибдоптерин-гуанидинуклеотида и один железосерный кластер 4Fe4S, тогда как NarH содержит три кластера 4Fe4S и один кластер 3Fe4S. Водорастворимый белок NarJ является шапероном для сборки протетической группы молибдоптерина в NarG. Сайт окисления менахинола находится близко к внешней стороне мембраны у гема *b*_L, и электроны сначала переносятся через мембрану

на гем b_H , затем через железосерные кластеры в NarH и наконец в NarG, где нитрат восстанавливается. Таким образом, благодаря активности NAR возникает трансмембранный электрохимический градиент.

Для высокой экспрессии оперона *narGHJI* *B. subtilis* необходимо наличие нитратов в питательной среде, а также анаэробный регуляторный белок FNR и двухкомпонентная регуляторная система ResDE [55, 80]. Две независимые исследовательские группы обнаружили NAR в аэробно выращенных клетках *B. subtilis* и ферментный комплекс SQR–NAR [17, 18], что указывает на то, что NAR в некоторой степени продуцируется также в аэробных условиях и что он в комплексе с SQR катализирует менахинон-зависимое восстановление нитрата путём окисления сукцината.

ЯВЛЯЕТСЯ ЛИ ДЫХАТЕЛЬНАЯ СИСТЕМА ШТАММА 168 ПОКАЗАТЕЛЬНОЙ ДЛЯ ВИДА *B. subtilis*?

Одомашнивание изолятов дикого типа *B. subtilis* при переносе их в лабораторные условия и легкость их генетической трансформации привели к преднамеренному и спонтанному мутагенезу, в результате чего появилось несколько штаммов, включая генетически и биохимически подробно исследованный штамм 168 [57, 83]. Дыхательная система *B. subtilis* исследовалась преимущественно у этого штамма [3, 4]. Как упоминалось ранее в этом обзоре, делеция генов цитохрома *caa₃* (*ctaCDEF*) [8, 31] или комплекса цитохрома *bc* (*qcrABC*) [22] в лабораторном модельном штамме 168 не влияет на способность к росту на различных субстратах, и также не наблюдается явных компенсаторных изменений в дыхательных ферментах. Это отсутствие фенотипа (фенотипической изменчивости) у мутантов интригует, но может быть объяснено некоторым неизвестным нарушением в передаче электронов от менахинола через комплекс цитохрома *bc* к цитохрому *caa₃* в штамме 168. Чтобы определить, является ли дыхательная система в штамме 168 репрезентативной для клеток *B. subtilis*, я провел сравнительное исследование с неодомашненным штаммом *B. subtilis* NCIB 3610. По сравнению со штаммом 168 он образует пелликулярные биопленки, большие массы, продуцирует экзополисахаридную капсулу, производит противомикробные препараты и содержит плазмиду, кодирующую более 100 белков [84]. Штамм 168 не содержит плазмид. Чтобы облегчить конструирование мутантов путем трансформации, я использовал

штамм 3A38, который представляет собой NCIB 3610 с заменой Gln12 на Leu в ComI (ингибитор естественной генетической компетентности) [85].

Секвенирование полного генома подтвердило, что штаммы NCIB 3610 и 3A38 различаются только точечной мутацией в гене *comI* [86]. При конструировании мутантных штаммов (WBS1-2 и WBS10) (табл. 3) было обнаружено, что одна менахинол-оксидаза, цитохром *aa₃* или цитохром *bd*, необходима для роста NCIB 3610 в кислородных условиях, то есть мутанты с двойной делецией *qoxABCD cydABCD* не могут быть получены точно так же, как в случае штамма 168 [8]. Штаммы WBS4, WBS5 и WBS7 лишены способности окислять TMPD, что свидетельствует о том, что эта активность в NCIB 3610 зависит от цитохрома *caa₃*, как и ожидалось, исходя из свойств штамма 168 [31].

Было обнаружено, что ростовые свойства мутантов по цитохромам штамма NCIB 3610 неотличимы от свойств соответствующих мутантов штамма 168. Т.е. условия роста в жидкой среде NSMP [87] или на чашках с триптозным кровяным агар-агаром (ТВАВ) («Difco Chem Co», США) отрицательно влияли на те мутантные штаммы, у которых отсутствовал цитохром *aa₃*, тогда как те, у которых отсутствовали ферменты ветви цитохрома *bc–caa₃* или цитохром *bd*, росли подобно родительскому штамму. Влияние на рост, вызванное дефицитом цитохрома *aa₃*, зависит от добавления в питательную среду $\geq 0,1\%$ (w/v) глюкозы. Штаммы 168, NCIB 3610 и 3A38 не показали видимых различий в составе и содержании цитохромов, что было продемонстрировано на изолированных мембранах с помощью спектроскопии в видимом свете с получением разностных спектров (восстановленные аскорбатом и дитионитом минус окисленные феррицианидом). Для анализа состава цитохромов в мутантах бактерии выращивали на NSMP с добавлением 1% (w/v) глюкозы, чтобы избежать различий в скорости роста. Спектры NCIB 3610 с делецией *ctaCD*, *qoxABCD*, *cydABCD* и *qcrABC* соответственно и мутантов с двойной делецией (рисунок) были сходны со спектрами соответствующих делеционных мутантов штамма 168. Результаты показывают, что респираторные компоненты лабораторного штамма 168 являются репрезентативными для видов *B. subtilis*.

Суперкомплекс цитохромов *bc–caa₃* связывается с KinB, и было высказано предположение, что KinB каким-то образом может чувствовать прохождение электронов через суперкомплекс и тем самым отслеживать реальное парциальное давление кислорода [88]. В поддержку этого сообщалось, что инактивация генов ци-

Таблица 3. Описание штаммов *B. subtilis*, использованных в работе

Название	Генотип	Источник/Ссылка
168 (1A1)	<i>trpC2</i>	BGSC ^a
NCIB 3610 (3A1)	Дикий тип	BGSC ^a
3A38	<i>comI</i> (мутант NCIB 3610)	BGSC ^a /[85]
LUH14	<i>trpC2 ΔqoxABCD::kan</i>	[8]
LUW35	<i>trpC2 ΔcydABCD::tet</i>	[51]
LUH60	<i>trpC2 Δqcr::neo</i>	[23]
LW3110	<i>trpC2 ΔctaCD::cat</i>	C. von Wachenfeldt
WBS1	<i>comI trpC2 ΔqoxABCD::kan</i>	LUH14→3A38
WBS2	<i>comI trpC2 ΔcydABCD::tet</i>	LUW35→3A38
WBS3	<i>comI trpC2 Δqcr::neo</i>	LUH60→3A38
WBS4	<i>comI trpC2 ΔctaCD::cat</i>	LW3110→3A38
WBS5	<i>comI trpC2 ΔqoxABCD::kan ΔctaCD::cat</i>	LW3110→WBS1
WBS6	<i>comI trpC2 Δqcr::neo ΔctaCD::cat</i>	LW3110→WBS3
WBS7	<i>comI trpC2 ΔcydABCD::tet ΔctaCD::cat</i>	LW3110→WBS2
WBS8	<i>comI trpC2 Δqcr::neo ΔqoxABCD::kan</i>	LUH14→WBS3
WBS10	<i>comI trpC2 Δqcr::neo ΔcydABCD::tet</i>	LUW35→WBS3

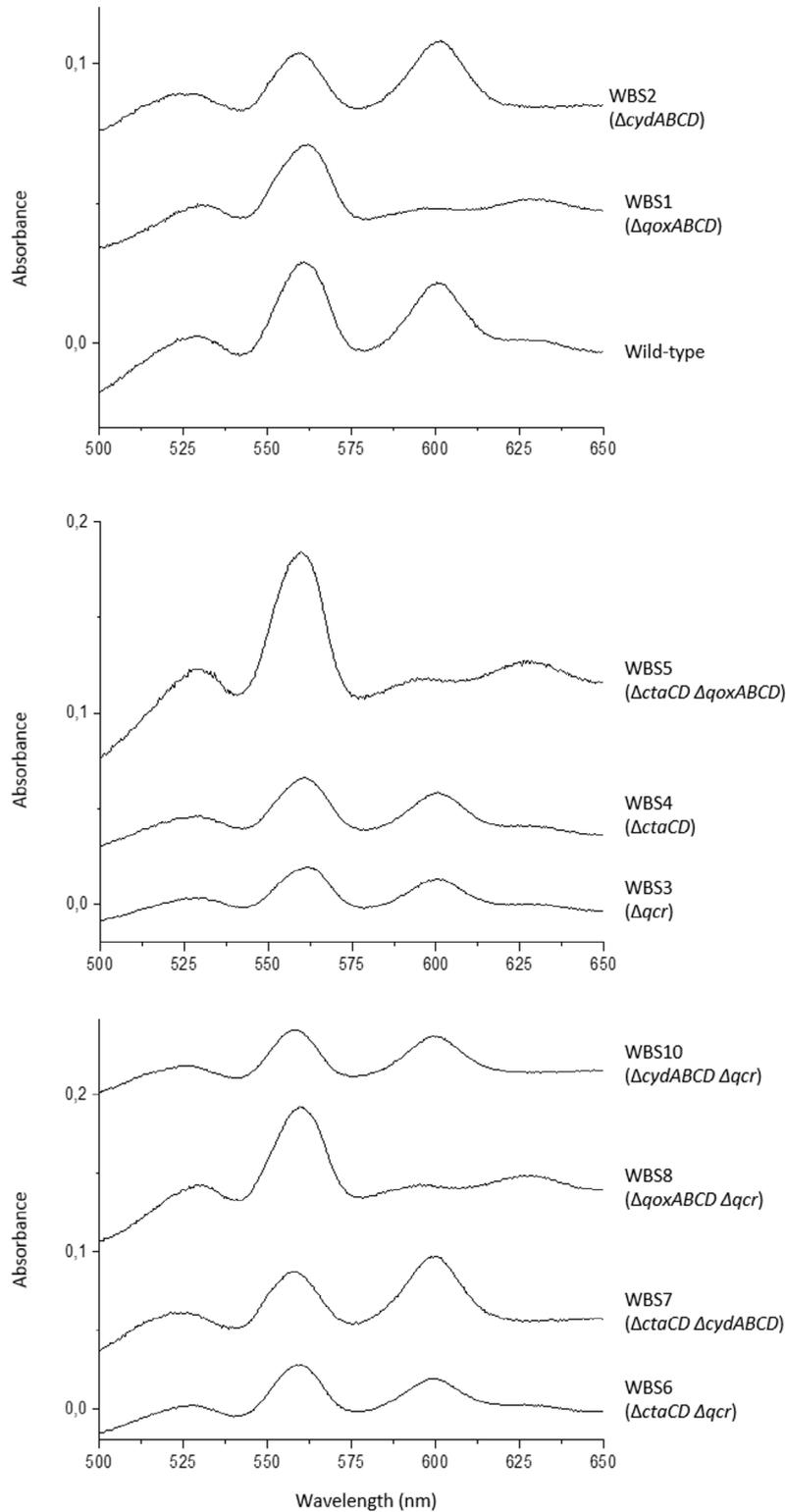
Примечание. Мутантные производные 3A38 были получены путём трансформации, как описано Hoch [107]. Стрелка указывает на происхождение хромосомной ДНК и на трансформированный штамм. Трансформанты отбирали на чашках с агаром ТВАВ с добавлением 1% (w/v) глюкозы и соответствующих антибиотиков в следующих концентрациях: хлорамфеникол, 3 мкг/мл; канамицин, 7,5 мкг/мл; тетрациклин, 15 мкг/мл. ^a Bacillus Genetic Stock Center, Ohio, USA.

тохрома *saaz*, или комплекса цитохрома *bc* в штамме NCIB 3610 влияет на продукцию биопленок [88]. Это открытие требует дальнейшего исследования. Я не обнаружил разницы в морфологии колоний между диким типом NCIB 3610 и его мутантными производными WBS3 (*Δqcr*) и WBS4 (*ΔctaCD*) (табл. 3) после двухнедельной инкубации на чашках MSgg при 37 °C. Более того, в исследованиях с *Bacillus amyloliquefaciens* было замечено, что мутанты с делецией генов *cta* или *qcr* имеют нормальную морфологию колоний, тогда как у мутантов с делецией *qox*, выращенных при пониженном давлении кислорода, было нарушено образование биопленок [89].

ЧТО ЕЩЕ ПРЕДСТОИТ ВЫЯСНИТЬ О РЕСПИРАТОРНЫХ ЦИТОХРОМАХ *Bacillus subtilis*?

Основные остающиеся загадки в отношении аэробной респираторной системы *B. subtilis* — это физиологическая роль ветви цитохром *c*-оксидазы, идентичность доноров и акцепторов электронов для цитохромов *c*-550 и *c*-551, идентичность цитохрома *bb'*, а также состав и физиологическая роль в метаболизме YthAB. Если

найти объяснение тому, что менахинон-зависимый перенос электронов в респираторной системе *B. subtilis* облегчается при энергизации мембраны, и что этот феномен проявится не только благодаря SQR [90], можно решить некоторые из упомянутых проблем. Это также может помочь исследовать дыхательную способность и состав цитохромов эндоспор и прорастающих клеток. Исследования цитохромов в эндоспорах *B. subtilis* проводились очень давно [91], когда большинство современных методов молекулярного анализа были недоступны, а эндоспоры были гораздо менее изучены на молекулярном уровне [92]. Другое неизученное направление — это перемещение респираторных белков в клетке, то, как они динамически взаимодействуют и распределяются вдоль цитоплазматической мембраны во время роста бактерии. Например, ферменты и суперкомплексы могут собираться в первую очередь на полюсах или на боковой стороне палочковидной бактерии. Во время многочасового и энергоёмкого процесса биогенеза эндоспор цитохромные комплексы, возможно, неравномерно распределяются на разных мембранах материнской клетки и будущей споры. Исследования динамики субклеточного распределения мембранных белков зависят от доступности техники с высоким визуальным разреше-



Разностные спектры поглощения видимого света (восстановленный минус окисленный) для изолированных мембран *B. subtilis* NCIB 3610 дикого типа и цитохром-дефицитных мутантов (табл. 3). Мембраны были выделены из указанных штаммов, выращенных в NSMP, pH 7,0 с добавлением 1% (w/v) глюкозы. Культуры собирали в конце фазы экспоненциального роста и мембраны выделяли, как описано ранее [87]. Разностные спектры материала мембран (3 мг/мл мембранного белка в 20 мМ натриевом буфере MOPS/HCl, pH 7,4, 1 мМ KCN) – восстановленные дитионитом минус окисленные феррицианидом – регистрировали при комнатной температуре в кювете объемом 1 мл (световой путь 10 мм) с использованием Olis Inc. – модернизированного спектрофотометра Aminco DW-2, Германия, щель – 1 мм

нием для работы с живыми дышащими клетками и с функционирующими флуоресцентно мечеными белками.

Практически не изучен биогенез гем-содержащих респираторных компонентов и не определены связанные с этим факторы сборки. Однако биогенез гема А и цитохрома *c* *B. subtilis* изучен достаточно подробно [27, 28]. Путем скрининга трех коллекций мутантов *B. subtilis* мы недавно обнаружили два новых фактора сборки цитохром *c*-оксидазы – CtaK и CtaM [30]. Таким образом, стало известно, что для синтеза цитохрома *caa*₃ *B. subtilis* требуется двенадцать различных белков. Для некоторых из этих факторов роль в сборке неясна или непонятна на механистическом уровне. Функция АТФ-связывающих белков CydC и CydD при сборке активного цитохрома *bd* не изучена ни у одной бактерии. Что касается биосинтеза SQR, то белок SdhC в мембране, по-видимому, изменяет конформацию при присоединении гема с образованием цитохрома *b*-558, и это изменение позволяет связывать цитоплазматическую субъединицу железосерных белков SdhB и SdhA, содержащую ковалентно связанный FAD. Неизвестно, как гем доставляется в SdhC, и требуются ли определенные факторы сборки для вставки двух групп гема. Когда три Sdh полипептида *B. subtilis* продуцируются в клетках *E. coli*, цитохром *b*-558 образуется в мембране, но SdhA не флавилируется и остается в цитоплазме, не связываясь с цитохромом *b*-558 [93–95]. На основании этих фактов в то время было высказано предположение, что либо для посттрансляционной модификации SdhA необходим специфический фактор, отсутствующий в клетках *E. coli*, либо этот процесс заблокирован [94]. В дальнейшем белки, которые участвуют в флавилировании полипептида SdhA, были обнаружены у нескольких организмов [96, 97], но не у *B. subtilis*. Примечательно, что 6-гидрокси-D-никотиноксидаза *Arthrobacter oxydans*, которая имеет FAD, ковалентно связанный таким же образом, как и в SQR, флавилируется в *B. subtilis* [98]. SdhA – это единственный белок с ковалентно связанным FAD в *B. subtilis*, и FAD не требуется для сборки тримера SQR в мембране [99, 100]. Предполагается найти гены, кодирующие фактор(ы) флавилирования SdhA, путем скрининга мутантов *B. subtilis*, лишенных SQR-активности, на наличие мутаций, расположенных вне кластера *sdhCAB* в хромосоме [101], но о таких мутантах пока не сообщалось.

B. subtilis оказалась полезной модельной системой для исследования функционирования и сборки респираторных ферментов. Основными причинами этого являются простота молекулярно-генетических манипуляций, роста и выделения мембран, а также то, что для аэробного роста не требуется ни одного белкового компонента дыхательной системы, что позволяет проводить эксперименты с цитохром-дефицитными мутантами. Очевидно, что *B. subtilis* в ближайшие десятилетия станет организмом, который будет использоваться для исследования аспектов биоэнергетики, общих для аэробных клеток или специальных для грамположительных бактерий.

Благодарности. Обзор написан в память об Александре Александровиче Константинове. Наши лаборатории в Лундском Университете и Московском государственном университете активно сотрудничали в исследованиях респираторных цитохромов *B. subtilis* в период с 1993 по 1999 год при поддержке грантов Шведской королевской академии наук. Это привело, кроме прочего, к публикациям статей из списка литературы [57, 68, 90]. Благодарю Андре Франка за практическую помощь в конструировании и анализе мутантных штаммов.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовом или ином аспекте.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных автором исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Arjes, H. A., Vø, L., Dunn, C. M., Willis, L., DeRosa, C. A., et al. (2020) Biosurfactant-mediated membrane depolarization maintains viability during oxygen depletion in *Bacillus subtilis*, *Curr. Biol.*, **30**, 1-12, doi: 10.1016/j.cub.2020.01.073.
2. Nicholson, W. N., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 548-572.
3. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1992) Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes, *FEMS Microbiol. Lett.*, **100**, 91-100.
4. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (2002) Respiratory cytochromes, other heme proteins, and heme biosynthesis, in *Bacillus subtilis and its closest relatives. From genes to cells.* (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. eds) ASM Press, Washington DC, pp. 63-179.

5. Zhu, B., and Stülke, J. (2018) SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res.*, **46**, D743-D748, doi: 10.1093/nar/gkx908.
6. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases, *J. Bacteriol.*, **176**, 5587-5600.
7. Zamboni, N., and Sauer, U. (2003) Knockout of the high-coupling cytochrome *aa*₃ oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**, 121-126, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00614-1.
8. Winstedt, L., and von Wachenfeldt, C. (2000) Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome *aa*₃ or cytochrome *bd*, is required for aerobic growth, *J. Bacteriol.*, **182**, 6557-6564.
9. Santana, M., Kunst, F., Hullo, M. F., Rapoport, G., Danchin, A., and Glaser, P. (1992) Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *gox* operon from *Bacillus subtilis* encoding the *aa*₃-600 quinol oxidase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10225-10231.
10. Larsson, J. T., Rogstam, A., and von Wachenfeldt, C. (2005) Coordinated patterns of cytochrome *bd* and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, **151**, 3323-3335.
11. Borisov, V., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovsky, M. I. (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1398-1413.
12. Schiott, T., and Hederstedt, L. (2000) Efficient spore synthesis in *Bacillus subtilis* depends on the CcdA protein, *J. Bacteriol.*, **182**, 2845-2854.
13. Le Brun, N. E., Bengtsson, J., and Hederstedt, L. (2000) Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*, *Mol. Microbiol.*, **36**, 638-650.
14. Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis, *J. Biol. Chem.*, **278**, 17852-17858, doi: 10.1074/jbc.M300103200.
15. Xu, J., Ding, Z., Liu, B., Yi, S. M., Li, J., et al. (2019) Structure of the cytochrome *aa*₃-600 heme-copper menaquinol oxidase bound to inhibitor HQNO shows TM0 is part of the quinol binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 872-876.
16. Melo, A. P. M., and Teixeira, M. (2016) Supramolecular organization of bacterial aerobic respiratory chains: from cells and back, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 190-197.
17. Sousa, P. M. F., Videira, M. A. M., Santos, F. A. S., Hood, B. L., Conrads, T. P., and Melo, A. M. P. (2013) The *bc:caa*₃ supercomplexes from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: a megacomplex organization? *Arch. Biochem. Biophys.*, **537**, 153-160.
18. Montes de Oca, L. Y. J. G., Chagolla-Lopez, A., de la Vara, L., Cabellos-Alevar, T., Gomez-Lojero, C., and Gutierrez Cirlos, E. B. (2012) The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **44**, 473-486.
19. Gong, H., Li, J., Xu, A., Tang, Y., Ji, W., Gao, R., et al. (2018) An electron transfer path connects subunits of a mycobacterial respiratory supercomplex, *Science*, **362**, eaat8923, doi: 10.1126/science.aat8923.
20. Wiseman, B., Nitharwal, R. G., Fedotovskaya, O., Schäfer, J., Guo, H., et al. (2018) Structure of a functional obligate complex III₂IV₂ respiratory supercomplex from *Mycobacterium smegmatis*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **25**, 1128-1136, doi: 10.1038/s41594-018-0160-3.
21. Montes de Oca, L. Y. J. G., Avelar, T. C., Picón Garrido, G. I., Chagoya-López, A., González de la Vara, L., et al. (2016) Cardiolipin deficiency causes a dissociation of the *bc:caa*₃ megacomplex in *B. subtilis* membranes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **48**, 451-467.
22. Yu, J., Hederstedt, L., and Piggot, P. J. (1995) The cytochrome *bc* complex (menaquinone:cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization, *J. Bacteriol.*, **177**, 6751-6760.
23. Yu, J., and Le Brun, N. E. (1998) Studies of the cytochrome subunits of menaquinone:cytochrome *c* reductase (*bc* complex) of *Bacillus subtilis*. Evidence for the covalent attachment of heme to the cytochrome *b* subunit, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8860-8866.
24. Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S. S., and Cramer, W. A. (2008) Structure-function of the cytochrome *b₆f* complex, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1349-1350.
25. De Vitry, C. (2011) Cytochrome *c* maturation system on the negative side of bioenergetic membranes: CCB or system IV, *FEBS J.*, **278**, 4189-4197.
26. Bengtsson, J., von Wachenfeldt, C., Winstedt, L., Nygaard, P., and Hederstedt, L. (2004) CtaG is required for formation of active cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, **150**, 415-425.
27. Simon, J., and Hederstedt, L. (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis system II, *FEBS J.*, **278**, 4179-4188, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08374.x.
28. Hederstedt, L. (2012) Heme A biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 920-927, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.03.025.
29. Mattatall, N. R., Jazairi, J., and Hill, B. C. (2000) Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 28802-28809.
30. Von Wachenfeldt, C., Hallgren, J., and Hederstedt, L. (2020) Cytochrome *c* oxidase biosynthesis factors in *Bacillus subtilis*: Discovery of YtkA (CtaK) and YozB (CtaM), in press.
31. Van der Oost, J., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Saraste, M. (1991) *Bacillus subtilis* cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two *aa*₃-type oxidases, *Mol. Microbiol.*, **5**, 2063-2072.
32. Contreras-Zentella, M., Mendoza, G., HMembrillo-Hernández, J., and Escamilla, J. E. (2003) A novel double heme substitution produces a functional *bo*₃ variant of the quinol oxidase *aa*₃ of *Bacillus cereus*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 31473-31478.
33. Sone, N., and Fujiwara, Y. (1991) Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome *c* oxidase from thermophilic bacterium PS3, *FEBS Lett.*, **288**, 154-158.
34. Svensson, B., Lubben, M., and Hederstedt, L. (1993) *Bacillus subtilis* CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis, *Mol. Microbiol.*, **10**, 193-201.
35. Hederstedt, L., Lewin, A., and Throne-Holst, M. (2005) Heme A synthase enzyme functions dissected by mutagenesis of *Bacillus subtilis* CtaA, *J. Bacteriol.*, **187**, 8361-8369, doi: 10.1128/JB.187.24.8361-8369.2005.
36. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1990) *Bacillus subtilis* 13-kilodalton cytochrome *c*-550 encoded by *cccA* consists of a membrane-anchor and a heme domain, *J. Biol. Chem.*, **265**, 13939-13948.
37. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1993) Physicochemical characterisation of membrane-bound and water-soluble forms of *Bacillus subtilis* cytochrome *c*-550, *Eur. J. Biochem.*, **212**, 499-509.
38. Bengtsson, J., Rivolta, C., Hederstedt, L., and Karamata, D. (1999) *Bacillus subtilis* contains two small *c*-type cytochromes with homologous heme domains but different types of membrane anchors, *J. Biol. Chem.*, **274**, 26179-26184.
39. Fujiwara, Y., Oka, M., Hamamoto, T., and Sone, N. (1993) Cytochrome *c*-551 of the thermophilic bacterium PS3, DNA sequence and analysis of the mature cytochrome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1144**, 213-218.

40. Sone, N., and Toh, H. (1994) Membrane-bound *Bacillus* cytochromes *c* and their phylogenetic position among bacterial class I cytochromes *c*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 203-210.
41. Benini, S., Gonzales, A., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., van Beeumen, J. J., and Ciurli, S. (2000) Crystal structure of oxidized *Bacillus pasteurii* cytochrome *c553* at 0.97-Å resolution, *Biochemistry*, **39**, 13115-13126, doi: 10.1021/bi000402j.
42. Monedero, V., Boël, G., and Deutscher, J. (2001) Catabolite regulation of the cytochrome *c550*-encoding *Bacillus subtilis* *ccaA* gene, *J. Mol. Biol. Biotech.*, **3**, 433-438.
43. Hambræus, G., von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (2003) Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs, *Mol. Genet. Genomics*, **269**, 706-714, doi: 10.1007/s00438-003-0883-6.
44. Anderson, I., Sorokin, A. K., Kapratl, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., et al. (2005) Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **250**, 175-184, doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.008.
45. Wilson, A. C., Hoch, J., and Perego, M. (2009) Two small *c*-type cytochromes affect virulence gene expression in *Bacillus anthracis*, *Mol. Microbiol.*, **72**, 109-123.
46. Gustavsson, T., Trane, M., Moparthi, V. K., Miklovyte, E., Mopharti, L., Gorecki, K., et al. (2010) A cytochrome *c* fusion protein domain for convenient detection, quantification, and enhanced production of membrane proteins in *Escherichia coli*-expression and characterization of cytochrome-tagged complex I subunits, *Protein Sci.*, **19**, 1445-1460, doi: 10.1002/pro.424.
47. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffé, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microbial. Physiol.*, **71**, 171-234.
48. Sakamoto, J., Koga, E., Mizuta, T., Sato, C., Noguchi, S., and Sone, N. (1999) Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 147-158, doi: 10.1016/s0005-2728(99)00012-2.
49. Safarian, S., Rajendran, C., Müller, H., Preu, J., Langer, J. D., et al. (2016) Structure of a *bd* oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases, *Science*, **352**, 583-586.
50. Safarian, S., Hahn, A., Mills, D. J., Radloff, M., Eisinger, M. L., et al. (2019) Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases, *Science*, **366**, 100-104.
51. Winstedt, L., Yoshida, K., Fujita, Y., and von Wachenfeldt, C. (1998) Cytochrome *bd* biosynthesis in *Bacillus subtilis*: characterization of the *cydABCD* operon, *J. Bacteriol.*, **180**, 6571-6580.
52. Kjelgaard, P. (2007) *Studies on Haemproteins of Gram-positive Bacteria*, PhD thesis, Lund University, Lund, Sweden.
53. Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L., and Wachenfeldt, C. V. (2000) *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome *bd*-type respiratory oxidase, *J. Bacteriol.*, **182**, 3863-3866.
54. Puri-Taneja, A., Schau, M., Chen, Y., and Hulett, F. M. (2007) Regulators of the *Bacillus subtilis* *cydABCD* operon: identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD, *J. Bacteriol.*, **189**, 3348-3358, doi: 10.1128/JB.00050-07.
55. Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Härtig, E. (2006) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **188**, 1103-1112.
56. Wang, E., Bauer, M., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D., and Von Wachenfeldt, C. (2008) Structure and functional properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex, *Mol. Microbiol.*, **69**, 466-478.
57. 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.
58. Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C. R., Médigue, C., Rocha, E. P. C., Sekowska, A., and Vallenet, D. (2017) *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement, *Microbial biotechnol.*, **11**, 3-17.
59. Thebeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kägi, J., et al. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Comm.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
60. Hederstedt, L. (2002) Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 74-83.
61. Lancaster, C. R. D. (2013) The di-heme family of respiratory complex II enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 679-687.
62. Hederstedt, L., and Ohnishi, T. (1992) Progress in succinate:quinone oxidoreductase research, in *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 163-198.
63. Berry, E. A., and Walker, F. A. (2008) Bis-histidine-coordinated hemes in four-helix bundles: how the geometry of the bundle controls the axial imidazole plane orientations in transmembrane cytochromes of mitochondrial Complexes II and III and related proteins, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 481-498.
64. Hägerhäll, C., and Hederstedt, L. (1996) A structural model for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases, *FEBS Lett.*, **389**, 25-31.
65. Matsson, M., Tolstoy, D., Aasa, R., and Hederstedt, L. (2000) The distal heme center in *Bacillus subtilis* succinate:quinone reductase is crucial for electron transfer to menaquinone, *Biochemistry*, **39**, 8617-8624.
66. Hägerhäll, C., Friden, H., Aasa, R., and Hederstedt, L. (1995) Transmembrane topology and axial ligands to hemes in the cytochrome *b* subunit of *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone reductase, *Biochemistry*, **34**, 11080-11089.
67. Hägerhäll, C., Aasa, R., von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1992) Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone oxidoreductase (complex II), *Biochemistry*, **31**, 7411-7421.
68. Smirnova, I. A., Hägerhäll, C., Konstantinov, A. A., and Hederstedt, L. (1995) HOQNO interaction with cytochrome *b* in succinate:menaquinone oxidoreductase from *Bacillus subtilis*, *FEBS Lett.*, **359**, 23-26.
69. Fedor, J. G., Rothery, R. A., Giraldi, K. S., and Weiner, J. H. (2014) Q-site occupancy defines heme heterogeneity in *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI), *Biochemistry*, **53**, 1733-1741.
70. Schnorppfeil, M., Jausch, I. G., Biel, S., Kröger, A., and Uden, G. (2001) Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase, *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3069-3074.
71. Madej, M. G., Nasiri, H. R., Hilgendorff, N. S., Schwalbe, H., Uden, G., and Lancaster, C. R. D. (2006) Experimental evidence for proton motive force-dependent catalysis by the diheme-containing succinate:menaquinone oxidoreductase from the gram-positive bacterium *Bacillus licheniformis*, *Biochemistry*, **45**, 15049-15055.
72. Schirawski, J., and Uden, G. (1998) Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential, *Eur. J. Biochem.*, **257**, 210-215.

73. Zaunmüller, T., Kelly, D. J., Glöckner, F. O., and Unden, G. (2006) Succinate dehydrogenase functioning by reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphate-reducing bacteria, *Microbiology*, **152**, 2443-2453.
74. Gong, H., Gao, Y., Zhou, X., Xiao, Y., Wang, W., et al. (2020) Cryo-EM structure of trimeric *Mycobacterium smegmatis* succinate dehydrogenase with a membrane-anchor SdhF, *Nat. Comm.*, **11**, 4245, doi: 10.1038/s41467-020-18011-9.
75. Lancaster, C. R. D., Kröger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution, *Nature*, **402**, 377-385.
76. Guan, H.-H., Hsieh, Y.-C., Lin, P.-J., Huang, Y.-C., Yoshimura, M., et al. (2018) Structural insights into the electron/proton transfer pathways in the quinol:fumarate reductase from *Desulfovibrio gigas*, *Sci. Rep.*, **8**, 14935, doi: 10.1038/s41598-018-33193-5.
77. Wöhri, A. B., Johansson, L. C., Wadsten-Hindrichsen, P., Wahlghren, W. Y., Fisher, G., et al. (2008) A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization, *Structure*, **16**, 1003-1009, doi: 10.1016/j.str.2008.06.003.
78. Baureder, M., and Hederstedt, L. (2011) Production, purification and detergent exchange of isotopically labeled *Bacillus subtilis* cytochrome b558 (SdhC), *Protein Expr. Purif.*, **80**, 97-101, doi: 10.1016/j.pep.2011.05.013.
79. Hoffman, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., and Jahn, D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system, *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 219-225.
80. Richardson, D. J., Berks, B. C., Rusell, D. A., Spiro, S., and Taylor, C. J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 165-178.
81. Bertero, M. G., Rothery, R. A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., et al. (2003) Insight into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 681-686.
82. Blasco, D., Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Giordano, G., and Rothery, R. A. (2001) The coordination and function of the redox centers of membrane-bound nitrate reductases, *Cell. Mol. Life Sci.*, **58**, 179-193.
83. Zeigler, D. R., Prágai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., et al. (2008) The Origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains, *J. Bacteriol.*, **190**, 6983-6995.
84. Burton, A. T., and Kearns, D. B. (2020) The large pBS32/pLS32c plasmid of ancestral *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **202**, e00290-20, doi: 10.1128/JB-00290-20.
85. Konkol, M. A., Blair, K. M., and Kearns, D. B. (2013) Plasmid-encoded ComI inhibits competence in the ancestral 3610 strain of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **195**, 4085-4093.
86. Nye, T. M., Schroeder, J. W., Kearns, D. B., and Simmons, L. A. (2017) Complete genome sequence of undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610, *Genome Announc.*, **5**, e00364-e00317, doi: 10.1128/genomeA.00364-17.
87. Hederstedt, L. (1986) Molecular properties, genetics, and biosynthesis of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex, *Methods Enzymol.*, **126**, 399-414.
88. Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., and Losick, R. (2013) Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrane-embedded histidine kinase, *Genes Dev.*, **27**, 887-899.
89. Zhou, X., Zhang, N., Xia, L., Li, Q., Shao, J., Shen, Q., and Zhang, R. (2018) ResDE two-component regulatory system mediates oxygen limitation-induced biofilm formation by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, *App. Environ. Microbiol.*, **84**, e02744-02717.
90. Azarkina, N., and Konstantinov, A. A. (2002) Stimulation of menaquinone-dependent electron transfer in the respiratory chain of *Bacillus subtilis* by membrane energization, *J. Bacteriol.*, **184**, 5339-5347.
91. Tochikubo, K. (1971) Changes in terminal respiratory pathways of *Bacillus subtilis* during germination, outgrowth and vegetative growth, *J. Bacteriol.*, **108**, 652-661.
92. Tan, I. S., and Ramamurthi, K. S. (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis*, *Environ. Microbiol. Rep.*, **6**, 212-225, doi: 10.1111/1758-2229.12130.
93. Magnusson, K., Hederstedt, L., and Rutberg, L. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of the structural gene for cytochrome b558 of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex, *J. Bacteriol.*, **162**, 1180-1185.
94. Hederstedt, L., Bergman, T., and Jörnvall, H. (1987) Processing of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase and cytochrome b-558 polypeptides. Lack of covalently bound flavin in the *Bacillus* enzyme expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **213**, 385-390.
95. Phillips, M. K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L., and Guest, J. R. (1987) Nucleotide sequence encoding the flavoprotein and iron-sulfur protein subunits of the *Bacillus subtilis* PY79 succinate dehydrogenase complex, *J. Bacteriol.*, **169**, 864-873.
96. Moosavi, B., Berry, E. A., Zhu, X.-L., and Yang, W.-C. (2019) The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 4023-4042.
97. Sharma, P., Maklashina, E., Cecchini, G., and Iverson, T. M. (2019) Maturation of the respiratory complex II flavoprotein, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **59**, 38-46.
98. Brandsch, R., and Hederstedt, L. (1989) Expression and flavinylation of *Arthrobacter oxydans* 6-hydroxy-D-nicotinamide oxidase in *Bacillus subtilis*, *J. Gen. Microbiol.*, **135**, 1093-1099.
99. Hederstedt, L. (1983) Succinate dehydrogenase mutants of *Bacillus subtilis* lacking covalently bound flavin in the flavoprotein subunit, *Eur. J. Biochem.*, **132**, 589-593.
100. Maguire, J., Magnusson, K., and Hederstedt, L. (1986) *Bacillus subtilis* mutant succinate dehydrogenase lacking covalently bound flavin: identification of the primary defect and studies on the iron-sulfur clusters in mutated and wild type enzyme, *Biochemistry*, **25**, 5202-5208.
101. Hederstedt, L., Magnusson, K., and Rutberg, L. (1982) Reconstitution of succinate dehydrogenase in *Bacillus subtilis* by protoplast fusion, *J. Bacteriol.*, **152**, 157-165.
102. Lauraeus, M., Haltia, T., Saraste, M., and Wikstrom, M. (1991) *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem A-containing terminal oxidases, *Eur. J. Biochem.*, **197**, 699-705.
103. Lauraeus, M., Wikström, M., Varotsis, C., Tecklenburg, M. J., and Babcock, G. T. (1992) Optical and resonance raman spectroscopy of the heme groups of the quinol-oxidizing cytochrome *aa*₃ of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*, **31**, 10054-10060.
104. Von Wachenfeldt, C., de Vries, S., and van der Oost, J. (1994) The Cu_A site of the *caa*₃-type oxidase of *Bacillus subtilis* is a mixed-valence binuclear copper centre, *FEBS Lett.*, **340**, 109-113.
105. De Vrij, W., van der Burg, B., and Konings, W. N. (1987) Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis*, *Eur. J. Biochem.*, **166**, 589-595.
106. Sone, N., Kutoh, E., and Yanagita, Y. (1989) Cytochrome *c*-551 from the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **977**, 329-334.
107. Hoch, J. A. (1991) Genetic analysis in *Bacillus subtilis*, *Methods Enzymol.*, **204**, 305-320.
108. Henning, W., Vo, L., Albanese, J., and Hill, B. C. (1995) High-yield purification of cytochrome *aa*₃ and cytochrome *caa*₃ oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes, *Biochem. J.*, **309**, 279-283.

MOLECULAR BIOLOGY OF *Bacillus subtilis* CYTOCHROMES *anno* 2020**Review****L. Hederstedt**

*The Microbiology Group, Department of Biology, Lund University,
22362 Lund, Sweden; E-mail: Lars.Hederstedt@biol.lu.se*

Bacillus subtilis serves as a model Gram-positive bacterium and an experimental system for research on respiratory enzymes. This review presents the heme proteins currently known for the well-characterized laboratory strain *B. subtilis* 168. It focuses on advances in research made during the last three decades concerning the function and composition of the cytochrome *bc* complex, terminal oxidases, and succinate:menaquinone oxidoreductase. The aerobic respiratory system of strain 168 seems representative for the species *B. subtilis*, as determined by the cytochrome composition of the undomesticated strain *B. subtilis* NCIB 3610 and a set of constructed cytochrome-deficient mutants of this strain. Unexplained and unsettled aspects of the molecular biology of respiratory cytochromes in *B. subtilis* are highlighted in the review.

Keywords: respiratory chain, Gram-positive bacteria, oxygen reductases, succinate dehydrogenase, NCIB 3610, cytochromes, *Bacillus*