

УДК 577.151.63

ТЕРМИНАЛЬНАЯ ОКСИДАЗА ЦИТОХРОМ *bd* ЗАЩИЩАЕТ БАКТЕРИИ ОТ ТОКСИЧЕСКОГО ВОЗДЕЙСТВИЯ СЕРОВОДОРОДА

Обзор

© 2021 В.Б. Борисов^{1*}, Е. Форте²

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bor@belozersky.msu.ru

² Римский университет Ла Сапиенца, Отдел биохимических наук, I-00185 Рим, Италия

Поступила в редакцию 15.09.2020

После доработки 15.09.2020

Принята к публикации 26.10.2020

Сероводород (H_2S) называют третьим (после окиси азота и окиси углерода) «газотрансмиттером» или эндогенной газообразной сигнальной молекулой. Эта молекула играет важную роль в организмах различных таксономических групп – от бактерий до животных и людей. В клетках млекопитающих H_2S в наномолярных концентрациях обладает цитопротекторным действием, однако в более высоких концентрациях он цитотоксичен. Первичной мишенью действия H_2S являются митохондрии. В субмикромольных концентрациях H_2S ингибирует митохондриальную гем-медную цитохром *c*-оксидазу, тем самым блокируя аэробное дыхание и окислительное фосфорилирование, что приводит к гибели клеток. Поскольку концентрация H_2S в кишечнике чрезвычайно высока, возникает вопрос: как населяющие его бактерии могут поддерживать функционирование своих кислород-зависимых дыхательных цепей переноса электронов в таких условиях? В обзоре дается ответ на этот вопрос: в свете недавно полученных экспериментальных данных рассматривается ключевая роль неканонических терминальных оксидаз типа *bd* в поддержании аэробного дыхания и роста энтеробактерии *Escherichia coli*, входящей в состав кишечной микробиоты, в присутствии H_2S в токсичных концентрациях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, гем-медная оксидаза, цитохром *bd*, гем.

DOI: 10.31857/S0320972521010036

СЕРОВОДОРОД: СВОЙСТВА, ОБРАЗОВАНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

H_2S – бесцветный, ядовитый, легковоспламеняющийся и едкий газ, пахнущий тухлыми яйцами. Он способен свободно диффундировать через мембраны [1]. Вслед за окисью азота (NO) и окисью углерода (CO), H_2S считается третьим «газотрансмиттером» или эндогенной газообразной сигнальной молекулой [2]. Это соединение играет важную роль в организмах различных таксономических групп – от бактерий до растений, животных и людей. Будучи слабой кислотой, H_2S в водном растворе находится в равновесии со своими анионами – гидросульфидом (HS^-) и сульфидом (S^{2-}), в соответствии с уравнением, приведенным на рис. 1. Используя значение pK_{a1} при 25 °C, которое в экспериментальных статьях варьируется в пределах 6,97–7,06 [3], можно рассчитать, что при физиологическом pH 7,4 69–73% общего пула сульфидов в растворе существует как HS^- , а 27–31% присутствует в форме H_2S . Большая величина pK_{a2} (12,2–19) предполагает, что количество S^{2-} в растворе пренебрежимо мало. В литературе « H_2S » часто используется для обозначения общего пула сульфидов ($H_2S + HS^- + S^{2-}$), если не указано иное.

В клетках млекопитающих эндогенная генерация H_2S происходит как неферментативными, так и ферментативными путями. Неферментативно H_2S образуется в реакциях тиолов или производных тиолов с другими соединениями, например при гидролизе неорганических сульфидных солей либо восстановлении пищевых неорганических полисульфидов глутатионом [4, 5]. Интересно, что образование H_2S из цистеина, предпочтительного для неферментативного пути субстрата, катализируется пиридоксаль-

фидом (HS^-) и сульфидом (S^{2-}), в соответствии с уравнением, приведенным на рис. 1. Используя значение pK_{a1} при 25 °C, которое в экспериментальных статьях варьируется в пределах 6,97–7,06 [3], можно рассчитать, что при физиологическом pH 7,4 69–73% общего пула сульфидов в растворе существует как HS^- , а 27–31% присутствует в форме H_2S . Большая величина pK_{a2} (12,2–19) предполагает, что количество S^{2-} в растворе пренебрежимо мало. В литературе « H_2S » часто используется для обозначения общего пула сульфидов ($H_2S + HS^- + S^{2-}$), если не указано иное.

Принятые сокращения: DTT – дитиотреитол; 3-MST – 3-меркаптопируват-серотрансфераза; CBS – цистатионин-β-синтаза; CSE – цистатионин-γ-лиаза; EhOASS – O-ацетилсерин сульфгидрилаза из *Entamoeba histolytica*; OAS – O-ацетил-L-серин; OASS – O-ацетилсерин сульфгидрилаза; Q₁ – 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутил)-1,4-бензохинон.

* Адресат для корреспонденции.



$$\text{p}K_{a1} = 6,97 - 7,06$$

$$\text{p}K_{a2} = 12,2 - 19$$

Рис. 1. Диссоциация H_2S в водном растворе. Значения $\text{p}K_a$ взяты из обзора Li и Lancaster [3]. (С цветными вариантами рис. 1–7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

фосфатом и свободным или связанным с гемом железом [6]. Ферментативная генерация H_2S у млекопитающих в основном обеспечивается цистатионин- β -синтазой (CBS), цистатионин- γ -лиазой (CSE) и 3-меркаптопируват-серотрансферазой (3-MST) [4, 5, 7]. CBS и CSE являются важными ферментами в пути транссульфурации, и оба используют пиридоксальфосфат в качестве кофактора. Каноническая реакция β -замещения, катализируемая CBS, представляет собой конденсацию гомоцистеина и серина с образованием цистатионина и воды. Однако в присутствии цистеина CBS может катализировать конденсацию гомоцистеина и цистеина с образованием цистатионина и H_2S . CSE обычно катализирует превращение цистатионина в цистеин и α -кетобутират. Вдобавок этот фермент способен генерировать H_2S посредством реакции α -, β -элиминирования с цистеином либо реакции γ -замещения между двумя молекулами гомоцистеина. 3-MST образует H_2S из 3-меркаптопирувата во взаимодействии с цистеинаминонотрансферазой или оксидазой D-аминокислот. Последние два фермента синтезируют 3-меркаптопируват с использованием цистеина в качестве субстрата [7, 8]. CBS обнаруживает высокий уровень экспрессии в астроцитах головного мозга, репродуктивных органах, поджелудочной железе. CSE в основном присутствует в печени, гладких мышцах, макрофагах, нейронах и почках. 3-MST преимущественно экспрессируется в кишечнике, почках, клетках сердечной мышцы, печени и нейронах [4].

H_2S вовлечен в регуляцию ряда физиологических процессов в нервной, сердечно-сосудистой, желудочно-кишечной и дыхательной системах. H_2S передает сигналы тремя различными механизмами. Во-первых, он действует как антиоксидант, утилизируя активные формы кислорода и азота. Во-вторых, это соединение связывается с гемами и/или восстанавливает их. В-третьих, H_2S участвует в персульфидировании (S-сульфгидратации), то есть посттрансляцион-

ной модификации остатков цистеина белка с образованием персульфидов белка [9]. Первичной мишенью передачи сигналов посредством H_2S являются митохондрии. В клетках млекопитающих H_2S проявляет двухфазный, зависимый от концентрации способ действия. При низких концентрациях H_2S обладает цитопротекторным действием, тогда как при более высоких концентрациях он цитотоксичен. В митохондриях H_2S в наномолярных концентрациях действует как цитопротектор: он поддерживает энергетический метаболизм, являясь субстратом для дыхательной цепи, предотвращает апоптоз, увеличивает митохондриальный биоге-нез [4]. В более высоких концентрациях H_2S подавляет дыхательную цепь за счет прямого связывания с цитохром *c*-оксидазой и ее ингибирования [10]. Это приводит к диссипации трансмембранного потенциала митохондрий, ингибированию аэробного синтеза АТФ и усилению производства активных форм кислорода [11]. В токсичных концентрациях H_2S также вызывает апоптоз клеток через канонический путь каспазного каскада [4].

В растительных клетках эндогенно генерируемый H_2S ослабляет окислительное повреждение клеток, вызванное стрессовыми факторами (тяжелыми металлами, экстремальными температурами, засухой, засолением почв) за счет активации антиоксидантных систем. Кроме того, H_2S способствует регуляции созревания плодов, прорастания семян, движения устьиц и других физиологических функций [12].

Бактерии обладают ортологами ферментов млекопитающих CBS, CSE и 3-MST для продукции H_2S . Кроме того, сульфатредуцирующие бактерии (SRB) образуют H_2S , задействуя путь так называемого диссимиляционного восстановления сульфата. В этом метаболическом пути анаэробного дыхания сульфат используется как конечный акцептор электронов с образованием H_2S в качестве основного конечного продукта [13]. У бактерий физиологические функции H_2S еще предстоит установить. Тем не менее сообщалось, что по крайней мере у *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* и *Bacillus anthracis* обладание способностью генерировать H_2S повышает устойчивость к антибиотикам за счет смягчения окислительного стресса, вызванного антибиотиками [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что цитопротекторное действие H_2S является универсальным защитным механизмом для всех форм жизни — от бактерий до людей [15].

В большинстве тканей млекопитающих стационарные внутриклеточные концентрации H_2S находятся в низком наномолярном диапа-

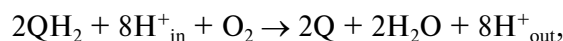
зоне. Например, концентрация H_2S , измеренная в тканях печени и мозга мышей, оказалась равна ~ 15 нМ [16]. Уровень H_2S в желудочно-кишечном тракте намного выше, чем в любом другом отделе тела млекопитающего. Кишечник млекопитающих заселяется бактериями на самых ранних этапах жизни. В толстой кишке «среднестатистического» мужчины весом 70 кг содержится $3,8 \times 10^{13}$ бактерий [17]. Они представлены 2172 различными видами 12 различных типов [18]. В отличие от других отделов тела, в кишечнике H_2S продуцируется не только CBS, CSE и 3-MST хозяина, но и в метаболизме аминокислот резидентной микробиоты кишечника, а также путем диссимиляционного восстановления сульфатов SRB [13]. Поэтому неудивительно, что уровень H_2S в кишечнике чрезвычайно высок. Например, у взрослых мышей средние концентрации H_2S составляют 1, 0,2 и 0,4 мМ в слепой кишке, проксимальном и дистальном отделах толстой кишки соответственно [19]. В кале человека эти значения находятся в диапазоне 0,3–3,4 мМ [20]. Сообщалось, что концентрация свободного газа H_2S в просвете кишечника у крыс и людей составляет 40–60 мкМ [21–23].

Хорошо известно, что H_2S в субмикромольных концентрациях подавляет каталитическую активность цитохром *c*-оксидазы, блокируя таким образом аэробное дыхание [24]. Но тогда неясно, как бактерии, обитающие в кишечнике людей и животных, могут поддерживать функционирование аэробной дыхательной цепи в условиях очень высокого содержания H_2S . Недавно Forte et al. [25] выдвинули гипотезу о том, что

микробы, живущие в обогащенной H_2S среде, например в кишечном тракте млекопитающих, обладают терминальной оксидазой, нечувствительной к ингибированию этим соединением даже при токсичных микромолярных концентрациях. Эта гипотеза была проверена на *E. coli* [25]. *E. coli* – важный член кишечного микробиома человека и других теплокровных животных. Толстая кишка человека обычно содержит несколько штаммов *E. coli* в любой момент времени [26]. *E. coli* имеет разветвленную аэробную дыхательную цепь, которая состоит из двух разных NADH:хинон оксидоредуктаз (NDH-I и NDH-II) и трех терминальных хинол:O₂ оксидоредуктаз (цитохромов *bd*-I, *bd*-II и *bo*₃) [27–32] (рис. 2).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА *bo*₃

Цитохром *bo*₃ принадлежит к семейству А суперсемейства гем-медных терминальных оксидаз [33–35] и катализирует следующую реакцию:



где QH_2 и Q представляют собой полностью восстановленную и полностью окисленную формы убихинона-8 соответственно [28].

Для того, чтобы восстановить одну молекулу O_2 до двух молекул H_2O , необходимы четыре электрона и четыре протона. Четыре электрона извлекаются при окислении двух QH_2 до двух Q . Окисление двух QH_2 сопровождается выделением четырех H^+ в периплазму (рис. 3). Четыре протона (так называемые «химические» протоны) забираются из цитоплазмы. Эта окислительно-восстановительная реакция также сопряжена с перемещением еще четырех протонов (так называемых «перекачиваемых» протонов) из цитоплазмы в периплазму поперек цитоплазматической мембраны – процесс, называемый «перекачкой» протонов. Для переноса всех протонов, взятых из цитоплазмы, оксидаза *bo*₃ использует два входных протонных канала, D и K (рис. 3). Предполагается, что в бактериальных гем-медных оксидазах семейства А D-канал используется для транспортировки всех «перекачиваемых» протонов и части «химических» протонов, тогда как K-канал служит для переноса остальных «химических» протонов [36]. Таким образом, в течение одного каталитического цикла фермента восемь протонов ($8H^+_{in}$) захватываются из цитоплазмы и восемь протонов ($8H^+_{out}$) высвобождаются в периплазму. В результате пе-

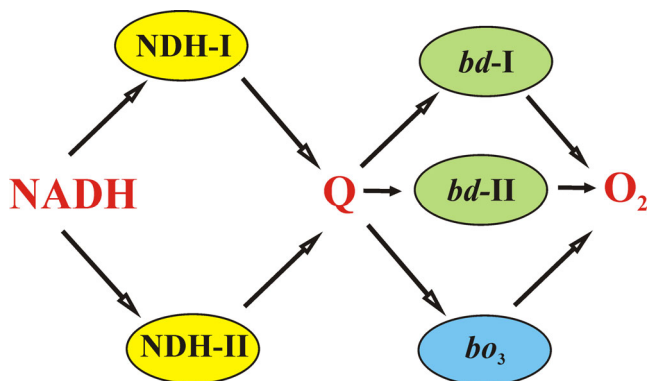


Рис. 2. Схема аэробной дыхательной цепи *Escherichia coli*. Две NADH:хинон оксидоредуктазы (NDH-I и NDH-II) переносят электроны от NADH на убихинон-8 (Q). Затем три терминальные хинол:O₂ оксидоредуктазы (цитохромы *bd*-I, *bd*-II и *bo*₃) переносят электроны от восстановленного убихинона-8 (убихинола-8) на молекулярный кислород (O₂) с образованием воды. Для простоты сукцинат:хинон оксидоредуктаза и другие субстрат-специфичные дегидрогеназы на рисунке не показаны

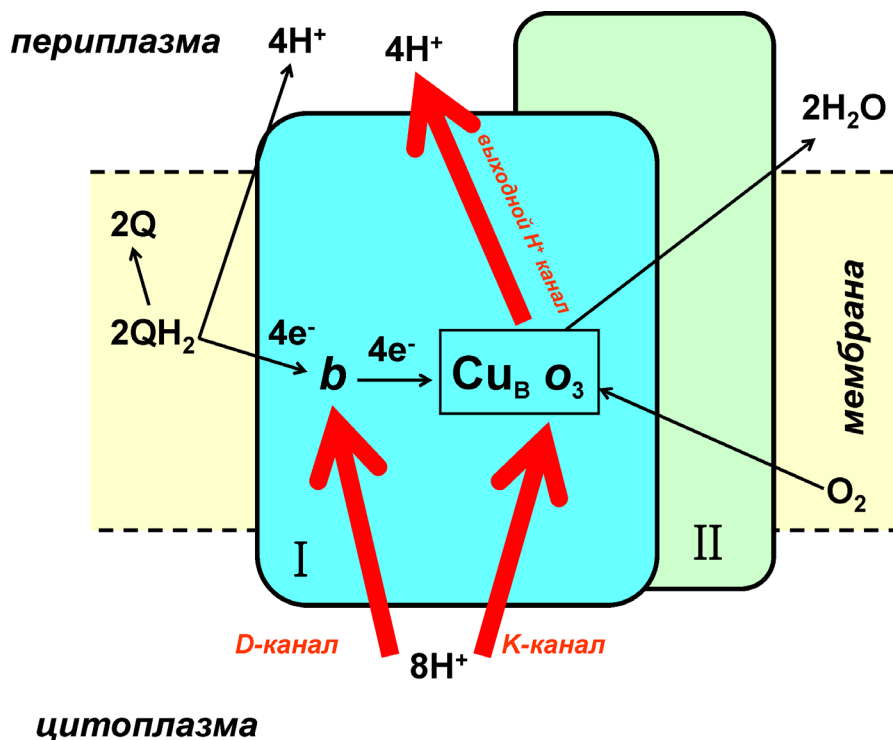


Рис. 3. Схематическое изображение структуры цитохрома bo_3 *Escherichia coli*. Показаны две основные субъединицы – I и II. Субъединица I содержит сайт связывания убинола, в котором убинол-8 (QH_2) окисляется до убинона-8 (Q), гем b и биядерный активный сайт, состоящий из гема o_3 и иона меди (Cu_B), в котором O_2 восстанавливается четырьмя электронами до $2H_2O$. Кроме того, показаны два входных протонных канала – D-канал и K-канал, а также предполагаемый выходной протонный канал

реноса зарядов поперек мембраны *E. coli* цитохром bo_3 генерирует протон-движущую силу.

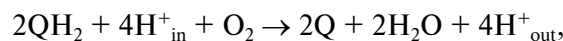
Получена трехмерная структура bo_3 -оксидазы *E. coli* с разрешением 3,5 Å [37]. Фермент состоит из четырех различных субъединиц: I–IV. Субъединицы I, II и III являются гомологами соответствующих субъединиц как митохондриальных, так и бактериальных цитохром c -оксидаз aa_3 -типа [38]. Субъединица I несет на себе все редокс-активные металлосоодержащие кофакторы: низкоспиновый гем b и биядерный активный центр, состоящий из близко расположенного высокоспинового гема o_3 и иона меди, называемого Cu_B (рис. 3). Долгое время считалось, что цитохром bo_3 содержит два сайта связывания убинола. Однако недавно было установлено, что эта оксидаза имеет только один сайт связывания убинола [39]. Электроны, извлеченные из убинола-8, переносятся на гем b , а затем в биядерный сайт (рис. 3). В биядерном сайте O_2 связывается с гемом o_3 и восстанавливается четырьмя электронами до $2H_2O$.

Оксидаза bo_3 экспрессируется в *E. coli*, когда клетки растут при высокой аэрации [40]. Цитохром bo_3 имеет низкое сродство к O_2 ($K_D >$

$> 0,3$ мМ [41]) по сравнению с цитохромом bd -I ($K_D = 0,28$ мкМ [42]).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА bd

Цитохромы bd -I и bd -II *E. coli* являются членами подсемейства L семейства терминальных оксидаз bd -типа [32, 43]. Ферменты катализируют следующую реакцию [44–48]:



где QH_2 и Q представляют собой соответственно полностью восстановленную и полностью окисленную формы хинона (убихинона-8 либо менахинона-8).

Цитохромы bd не содержат иона меди и не обнаруживают гомологии аминокислотных последовательностей с цитохромом bo_3 или любыми другими гем-медными оксидазами [34, 35, 49–53]. Оксидазы bd создают протон-движущую силу путем трансмембранного разделения зарядов [54, 55]. Однако, в отличие от гем-медных оксидаз, которые являются истинными протонными насосами [36, 56], цитохромы bd не способны

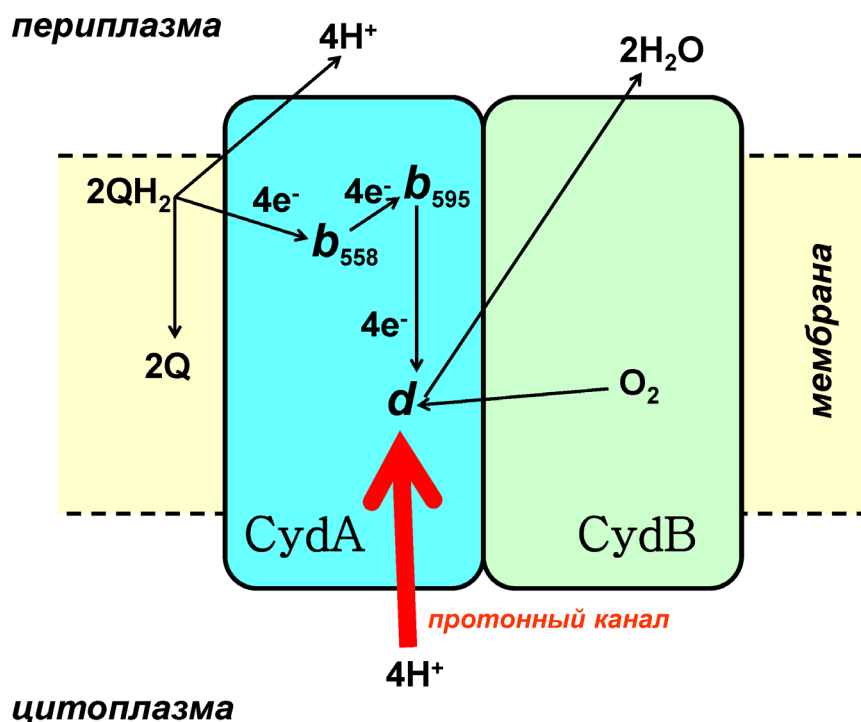


Рис. 4. Схематическое изображение структуры цитохрома *bd-I* *Escherichia coli*. Показаны две основные субъединицы – CydA и CydB. Субъединица CydA несет на себе сайт связывания хинола, в котором QH_2 (убихинол-8 или менахинол-8) окисляется до Q (убихинона-8 или менахинона-8), гем b_{558} , гем b_{595} и гем d . Последний является сайтом, в котором O_2 восстанавливается четырьмя электронами до $2\text{H}_2\text{O}$. Также показан один входной протонный канал

перекачивать протоны [57–59]. По этой причине отношение H^+/e^- (количество протонов, доставленных на периплазматическую сторону мембраны на один электрон) равно 1 как для цитохрома *bd-I* [54, 60], так и для цитохрома *bd-II* [60], тогда как в случае цитохрома bo_3 оно равно 2 [54].

Получена трехмерная структура цитохрома *bd-I* *E. coli* с разрешением 2,7 [61] и 3,3 Å [62]. Из структуры видно, что оксидаза *bd-I* состоит из четырех субъединиц: двух больших – CydA и CydB, и двух малых – CydX и CydH. Наличие субъединиц CydA и CydB в ферменте известно давно [63, 64]. Субъединица CydX была обнаружена совсем недавно [65–70]. О существовании субъединицы CydH (также называемой CydY) в цитохроме *bd-I* стало известно только из трехмерной структуры [61, 62]. Субъединица CydA содержит сайт окисления хинола и все три редокс-активных металлосодержащих кофактора: низкоспиновый гем b_{558} , высокоспиновый гем b_{595} и высокоспиновый гем d (рис. 4). Электроны, высвобождаемые при окислении хинола, переносятся на гем b_{558} , а затем на гем b_{595} и гем d . Последний связывает O_2 и восстанавливает его четырьмя электронами до $2\text{H}_2\text{O}$ (рис. 4). Многочисленные экспериментальные исследования указывают на то, что гем b_{595} и гем d

действуют как функциональный двухгемовый активный центр [71–84].

В дополнение к запасанию свободной энергии, высвобождаемой в экзергонической редокс-реакции восстановления O_2 , цитохром *bd-I* играет важную физиологическую роль [85–88]. В частности, было показано, что оксидаза *bd-I* участвует в защите *E. coli* от перекиси водорода [89–94], пероксинитрита [86, 95] и NO [96–100]. Однако ни одна из двух *bd*-оксидаз *E. coli*, по видимому, не защищает бактерию от CO [101].

Цитохром *bd-I* экспрессируется в *E. coli* в условиях дефицита кислорода [40, 102]. Переход клеток *E. coli* в стационарную фазу роста, рост бактерий в анаэробных условиях и фосфатное голодание приводят к индукции цитохрома *bd-II* [103, 104]. Вследствие высокого сродства к O_2 [42, 105] *bd*-фермент образует стабильный оксикомплекс, в котором O_2 связан с восстановленным гемом d [106–109].

ВЛИЯНИЕ H_2S НА ПОТРЕБЛЕНИЕ O_2 ТЕРМИНАЛЬНЫМИ ОКСИДАЗАМИ *E. coli*.

Forte et al. [25] исследовали влияние H_2S на скорость потребления O_2 изолированными очи-

щенными цитохромами *bd*-I, *bd*-II и *bo*₃ с помощью метода респирометрии с высоким разрешением. O₂-редуктазная активность этих дыхательных терминальных оксидаз поддерживалась добавленными в избытке восстанавливающими агентами: 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохиноном (Q₁) и дитиотреитолом (DTT). Как показано на рис. 5, а, добавление NaHS в концентрации ~7 мкМ к цитохрому *bo*₃ приводит к быстрому и эффективному ингибированию активности фермента. Кажущаяся концентрация полумаксимального ингибирования (*IC*₅₀), измеренная при pH 7,4, составила 1,1 мкМ NaHS [25]. Это значение согласуется с величиной кажущейся константы ингибирования (*K*_i) для митохондриальной цитохром *c*-оксидазы – 0,2–0,45 мкМ H₂S при pH 7,4 [10, 110–112]. Чтобы определить, является ли ингибирование цитохрома *bo*₃ обратимым либо необратимым, после внесения NaHS был добавлен расщепляющий H₂S фермент *O*-ацетилсерин сульфгидрилаза (OASS) из *Entamoeba histolytica* (*Eh*OASS) вместе с *O*-ацетил-L-серином (OAS). Известно, что OASS катализирует реакцию β-защемления, в которой β-ацетокси-группа OAS заменяется на HS⁻ с образованием L-цистеина и ацетата [113]. Как видно из рис. 5, а, добавление *Eh*OASS и OAS приводит к быстрому и полному восстановлению O₂-редуктазной активности фермента *bo*₃. Таким образом, было обнаружено, что ингибирование изолированного очищенного цитохрома *bo*₃ H₂S полностью обратимо. Напротив, в тех же экспериментальных условиях было показано, что как цитохром *bd*-I, так и цитохром *bd*-II нечувствительны к присутствию NaHS вплоть до ~60 мкМ этого соединения (рис. 5, а).

Чтобы убедиться, что наблюдаемая разница в чувствительности к H₂S между ферментами *bo*₃- и *bd*-типов не является следствием солюбилизации либо очистки цитохромов, было также изучено влияние H₂S на потребление O₂ суспензиями клеток *E. coli*. В этом случае O₂-редуктазная активность терминальных оксидаз поддерживалась эндогенными субстратами, а не искусственной электрон-донорной системой (DTT и Q₁). Были протестированы три мутантных штамма, каждый из которых имел только одну терминальную оксидазу: цитохром *bd*-I, цитохром *bd*-II или цитохром *bo*₃. Данные, полученные на бактериальных клетках, оказались очень похожими на результаты с изолированными очищенными ферментами [25]. Потребление O₂ мутантными клетками, содержащими цитохром *bo*₃ в качестве единственной терминальной оксидазы, быстро и полностью ингибировалось NaHS в концентрации 50 мкМ

(рис. 5, б). Подобно тому, что наблюдали в случае изолированной оксидазы *bo*₃, добавление *Eh*OASS и OAS приводило к быстрому и полному возобновлению потребления O₂ клетками (рис. 5, б). Никакого ингибирования потребления O₂ не обнаруживали, если 50 мкМ NaHS добавляли к мутантным клеткам, экспрессирующим в качестве единственной дыхательной

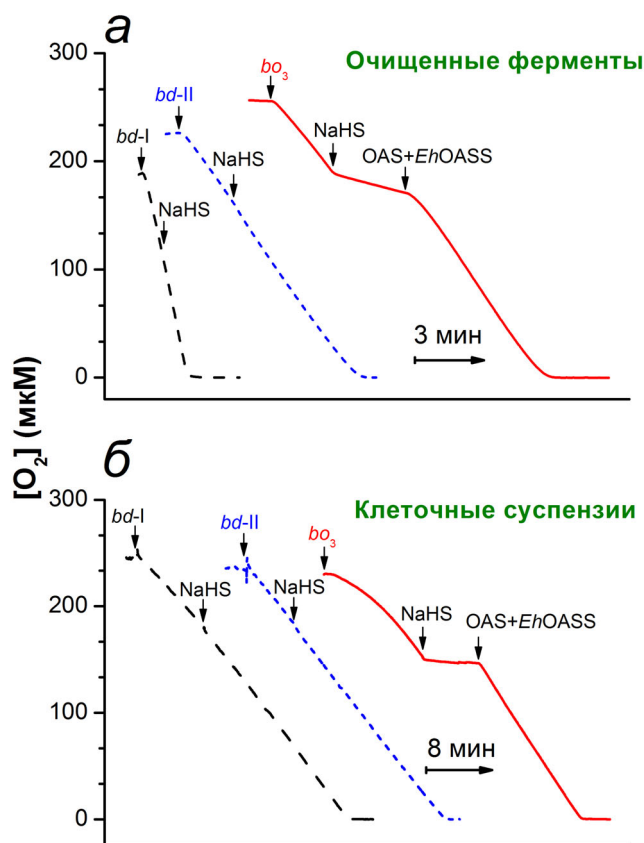


Рис. 5. Влияние H₂S на потребление O₂ терминальными оксидазами *Escherichia coli*. а – Потребление O₂ изолированными очищенными цитохромами *bd*-I, *bd*-II и *bo*₃ в присутствии избытка восстановителей (10 мМ DTT и 0,25 мМ Q₁). Добавление 7,2 мкМ NaHS вызывает быстрое ингибирование активности цитохрома *bo*₃. Дальнейшее добавление расщепляющего H₂S фермента *O*-ацетилсерин сульфгидрилазы из *Entamoeba histolytica* (*Eh*OASS) вместе с его субстратом *O*-ацетил-L-серином (OAS) приводит к быстрому и полному восстановлению O₂-редуктазной активности цитохрома *bo*₃. Добавление 58 мкМ NaHS, напротив, не ингибирует потребление O₂ ни цитохромом *bd*-I, ни цитохромом *bd*-II. б – Потребление O₂ клеточными суспензиями мутантных штаммов, которые содержат цитохром *bd*-I, цитохром *bd*-II или цитохром *bo*₃ в качестве единственной дыхательной терминальной оксидазы. Потребление O₂ клетками, полагающимися на *bo*₃ как единственную оксидазу, быстро ингибируется 50 мкМ NaHS. Однако это ингибирование снимается сразу после добавления *Eh*OASS и OAS. Добавление 50 мкМ NaHS не влияет на потребление O₂ клетками, имеющими *bd*-I или *bd*-II в качестве единственной оксидазы. Рисунок взят из работы Forte et al. [25] с изменениями

оксидазы либо цитохром *bd-I*, либо цитохром *bd-II* (рис. 5, б).

Похожие результаты были получены Korshunov et al. [114], которые исследовали влияние Na_2S на активность трех цитохромов в мембранных везикулах *E. coli*. Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что ферменты *bd*-типа делают возможным функционирование аэробной дыхательной цепи *E. coli* в присутствии H_2S .

ВЛИЯНИЕ H_2S НА РОСТ КЛЕТОК *E. coli*

Ввиду того, что активность оксидаз *bd-I* и *bd-II*, в отличие от цитохрома bo_3 , оказалась нечувствительной к H_2S , Forte et al. [25] решили проверить, поддерживают ли один или оба цитохрома *bd* *E. coli* также и рост бактерий в присутствии H_2S в культуральной среде. Влияние H_2S на рост клеток было протестировано на четырех штаммах *E. coli*: штамме дикого типа, в котором присутствуют все три терминальные оксидазы, и трех мутантных штаммах, каждый из которых обладает только одной оксидазой — *bd-I*, *bd-II* или bo_3 [25]. Было обнаружено, что добавление NaHS в концентрации 200 мкМ замедляет рост

клеток дикого типа (рис. 6, а). 200 мкМ NaHS резко подавляет рост клеток мутантного штамма, содержащего только цитохром bo_3 (рис. 6, б). Напротив, после добавления NaHS в той же концентрации к клеткам мутантных штаммов, имеющих в качестве единственной оксидазы либо *bd-I*, либо *bd-II*, кривая роста бактерий вовсе не изменяется (рис. 6, в) или изменяется очень мало (рис. 6, г).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что, в отличие от цитохрома bo_3 *E. coli*, как цитохром *bd-I*, так и цитохром *bd-II* этой бактерии способны поддерживать аэробное дыхание и рост клеток в присутствии H_2S . Это также может относиться и к другим бактериям, которые содержат терминальную оксидазу *bd*-типа в своих аэробных дыхательных цепях. Действительно, Saini et al. [115] недавно обнаружили, что H_2S стимулирует дыхание и рост *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycobacterium bovis* BCG и *Mycobacterium smegmatis*. Согласно их интерпретации полученных результатов, индуцированное H_2S ингибирование суперкомплекса цитохрома *bcc-aa₃* (служащего одной из двух терминальных оксидаз в дыхательной цепи микобактерий) приводит к перенаправлению электронов от менахинола на цитохром *bd*, тем самым стимулируя ды-

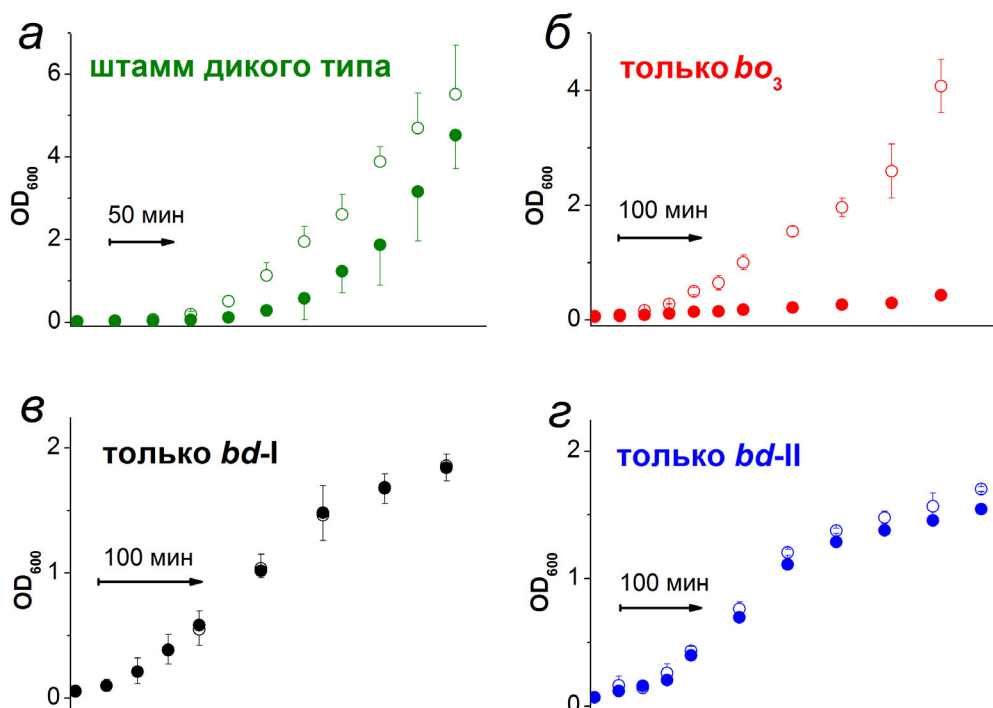


Рис. 6. Влияние H_2S на рост клеток *Escherichia coli*. Показаны кривые роста штамма дикого типа (а) и мутантных штаммов, обладающих цитохромом bo_3 (б), цитохромом *bd-I* (в) или цитохромом *bd-II* (г) в качестве единственной дыхательной терминальной оксидазы. Закрашенные и открытые круглые символы указывают на присутствие или отсутствие 200 мкМ NaHS в среде роста соответственно. Рисунок взят из работы Forte et al. [25] с изменениями

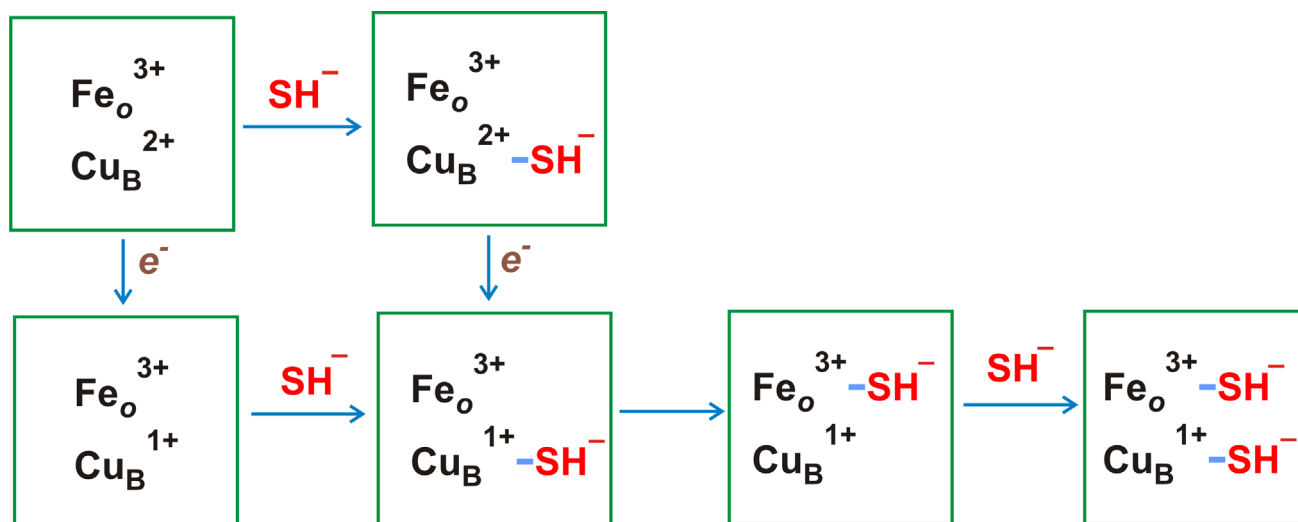


Рис. 7. Возможный механизм ингибирования гем-медной оксидазы цитохрома *bo*₃ *Escherichia coli* H₂S. Различные состояния каталитического биядерного сайта, состоящего из гема *o*₃ (показано железо гема *o*₃ – Fe_o) и меди Cu_B. Третий редокс-активный металлосодежающий кофактор – гем *b*, который не является частью биядерного сайта, на рисунке не показан

хание микобактерий [115]. Это согласуется с обсуждаемыми выше данными о нечувствительности оксидаз *bd*-типа *E. coli* к H₂S [25, 114].

ВОЗМОЖНЫЙ МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМА *bo*₃ *E. coli* H₂S

Ранее было показано, что H₂S обратимо ингибирует поглощение кислорода цитохром *c*-оксидазой из сердца быка [110, 111]. Ингибирование этого митохондриального гем-медного фермента с помощью H₂S является неконкурентным по отношению к цитохрому *c* и O₂ [110] и зависит от pH [116]. Начальная скорость инактивации изолированной цитохром *c*-оксидазы пропорциональна концентрации H₂S, при этом начальная константа скорости (k_{on}) при pH 7,4 равна $2,2 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{c}^{-1}$ [10]. Значения K_i , измеренные при pH 7,4, оказались в интервале 0,2–0,45 мкМ [10, 110–112]. H₂S (вероятно, в форме HS⁻) может связываться с Cu_B в любом из ее редокс-состояний (как с Cu_B¹⁺, так и с Cu_B²⁺), а с гемом *a*₃ – только в его окисленной форме [10]. Предполагается, что конечный комплекс фермент–ингибитор представляет собой форму «смешанной валентности», в которой Cu_A и гем *a* восстановлены, тогда как гем *a*₃ окислен и связан с H₂S [111, 117]. Cu_B в такой форме восстановлена и, возможно, также связана с H₂S, на что указывают данные спектроскопии электронного парамагнитного резонанса [24].

По аналогии с моделью ингибирования митохондриальной цитохром *c*-оксидазы H₂S [10], можно предложить следующую модель H₂S-опосредованного ингибирования цитохрома *bo*₃ *E. coli* (рис. 7). В ходе оборотов *bo*₃-оксидазы в стационарном состоянии молекула H₂S (HS⁻) промежуточно связывается с окисленной или восстановленной Cu_B, а затем переносится на окисленный гем *o*₃, тем самым блокируя реакцию этого высокоспинового гема с молекулярным кислородом. В конечном состоянии фермента *bo*₃, заингибированного H₂S, Cu_B восстановлен и, возможно, связан со второй молекулой H₂S (HS⁻) (рис. 7), а низкоспиновый гем *b*, вероятно, находится в восстановленной форме.

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

Благодарности. В.Б. Борисов благодарит В.П. Скулачева и А.Д. Виноградова за интерес к работе и полезное обсуждение. В.Б. Борисов также выражает глубокую признательность А.А. Константинову (скончался 1 мая 2020 г.). А.А. Константинов в 1993 году предложил В.Б. Борисову начать изучение цитохрома *bd*, когда автор был аспирантом.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B., and Moller, M. N. (2012) Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes, *PLoS One*, **7**, e34562, doi: 10.1371/journal.pone.0034562.
- Forte, E., and Giuffrè, A. (2016) How bacteria breathe in hydrogen sulphide-rich environments, *Biochem. J.*, **38**, 8-11, doi: 10.1042/BIO03805008.
- Li, Q., and Lancaster, J. R., Jr. (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology, *Nitric Oxide*, **35**, 21-34, doi: 10.1016/j.niox.2013.07.001.
- Murphy, B., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2019) Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease, *FASEB J.*, **33**, 13098-13125, doi: 10.1096/fj.201901304R.
- Powell, C. R., Dillon, K. M., and Matson, J. B. (2018) A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications, *Biochem. Pharmacol.*, **149**, 110-123, doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014.
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., and Hine, C. (2019) Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B₆, *Commun. Biol.*, **2**, 194, doi: 10.1038/s42003-019-0431-5.
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2014) Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 770-782, doi: 10.1089/ars.2013.5339.
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., et al. (2013) A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells, *Nat. Commun.*, **4**, 1366, doi: 10.1038/ncomms2371.
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018) Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation, *Chem. Rev.*, **118**, 1253-1337, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00205.
- Nicholls, P., Marshall, D. C., Cooper, C. E., and Wilson, M. T. (2013) Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome *c* oxidase, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1312-1316, doi: 10.1042/BST20130070.
- Szabo, C., Ransy, C., Modis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., et al. (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms, *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 2099-2122, doi: 10.1111/bph.12369.
- Corpas, F. J., and Palma, J. M. (2020) H₂S signaling in plants and applications in agriculture, *J. Adv. Res.*, **24**, 131-137, doi: 10.1016/j.jare.2020.03.011.
- Carbonero, F., Benefiel, A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., and Gaskins, H. R. (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease, *Front. Physiol.*, **3**, 448, doi: 10.3389/fphys.2012.00448.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., and Nudler, E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria, *Science*, **334**, 986-990, doi: 10.1126/science.1209855.
- Kimura, H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide, *Antioxid. Redox Signal.*, **20**, 783-793, doi: 10.1089/ars.2013.5309.
- Furne, J., Saeed, A., and Levitt, M. D. (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **295**, R1479-R1485, doi: 10.1152/ajpregu.90566.2008.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body, *PLoS Biol.*, **14**, e1002533, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- Hugon, P., Dufour, J. C., Colson, P., Fournier, P. E., Sallah, K., and Raoult, D. (2015) A comprehensive repertoire of prokaryotic species identified in human beings, *Lancet Infect. Dis.*, **15**, 1211-1219, doi: 10.1016/S1473-3099(15)00293-5.
- Deplancke, B., Finster, K., Graham, W. V., Collier, C. T., Thurmond, J. E., and Gaskins, H. R. (2003) Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, **228**, 424-433, doi: 10.1177/153537020322800413.
- Attene-Ramos, M. S., Wagner, E. D., Gaskins, H. R., and Plewa, M. J. (2007) Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage, *Mol. Cancer Res.*, **5**, 455-459, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0439.
- Levitt, M. D., Springfield, J., Furne, J., Koenig, T., and Suarez, F. L. (2002) Physiology of sulfide in the rat colon: use of bismuth to assess colonic sulfide production, *J. Appl. Physiol.*, **92**, 1655-1660, doi: 10.1152/jappphysiol.00907.2001.
- Suarez, F., Furne, J., Springfield, J., and Levitt, M. (1998) Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon, *Am. J. Physiol.*, **274**, G727-G733, doi: 10.1152/ajpgi.1998.274.4.G727.
- Jorgensen, J., and Mortensen, P. B. (2001) Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: implications for ulcerative colitis, *Dig. Dis. Sci.*, **46**, 1722-1732, doi: 10.1023/A:1010661706385.
- Hill, B. C., Woon, T. C., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1984) Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome *c* oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study, *Biochem. J.*, **224**, 591-600, doi: 10.1042/bj2240591.
- Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., et al. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., and Wold, A. E. (2006) Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 156-161, doi: 10.1128/AAC.50.1.156-161.2006.
- Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., et al. (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.
- Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as Acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
- Jünemann, S. (1997) Cytochrome *bd* terminal oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1321**, 107-127, doi: 10.1016/S0005-2728(97)00046-7.
- 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.

33. Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2012) The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 629-637, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.09.020.
34. 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.
35. 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.
36. 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.
37. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., et al. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site., *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 910-917, doi: 10.1038/82824.
38. Chepuri, V., Lemieux, L. J., Au, D. C.-T., and Gennis, R. B. (1990) The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa₃*-type family of the cytochrome *c* oxidases, *J. Biol. Chem.*, **265**, 11185-11192.
39. Choi, S. K., Schurig-Briccio, L., Ding, Z., Hong, S., Sun, C., and Gennis, R. B. (2017) Location of the substrate binding site of the cytochrome *bo₃* ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 8346-8354, doi: 10.1021/jacs.7b03883.
40. 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.
41. Svensson, M., and Nilsson, T. (1993) Flow-flash study of the reaction between cytochrome *bo* and oxygen, *Biochemistry*, **32**, 5442-5447, doi: 10.1021/bi00071a021.
42. Belevich, I., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Verkhovskiy, 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.
43. 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.
44. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
45. 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.
46. 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.
47. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffrè, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171-234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
48. Borisov, V. B. (2020) Effect of membrane environment on ligand-binding properties of the terminal oxidase cytochrome *bd*-I from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, **85**, 1603-1612, doi: 10.1134/S0006297920120123.
49. 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.
50. Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
51. 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.
52. 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.
53. Borisov, V. B. (2004) Mutations in respiratory chain complexes and human diseases, *Ital. J. Biochem.*, **53**, 34-40.
54. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
55. Jasaitis, A., Borisov, V. B., Belevich, N. P., Morgan, J. E., Konstantinov, A. A., and Verkhovskiy, M. I. (2000) Electrogenic reactions of cytochrome *bd*, *Biochemistry*, **39**, 13800-13809, doi: 10.1021/bi001165n.
56. Wikström, M., Morgan, J. E., and Verkhovskiy, 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.
57. Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., et al. (2005) Time-resolved electro-metric 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.
58. Belevich, I., Borisov, V. B., and Verkhovskiy, 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.
59. Borisov, V. B., Belevich, I., Bloch, D. A., Mogi, T., and Verkhovskiy, 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 *b₅₉₅*/heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907-7914, doi: 10.1021/bi800435a.
60. Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., Bloch, D. A., Han, H., et al. (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.
61. 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, doi: 10.1126/science.aay0967.
62. Theßeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., et al. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
63. 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.
64. 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.
 65. 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.
 66. 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.
 67. Hoerster, 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.
 68. 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.
 69. Hobson, J. J., Gallegos, A. S., Atha, B. W., 3rd, Kelly, J. P., Lein, C. D., et al. (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.
 70. Duc, K. M., Kang, B. G., Lee, C., Park, H. J., Park, Y. M., et al. (2020) The small protein CydX is required for cytochrome *bd* quinol oxidase stability and function in *Salmonella Typhimurium*: a phenotypic study, *J. Bacteriol.*, **202**, e00348-19, doi: 10.1128/JB.00348-19.
 71. 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, doi: 10.1073/pnas.90.12.5863.
 72. 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.
 73. 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.
 74. 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.
 75. 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.
 76. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J. L., Zhang, J., et al. (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.
 77. Arutyunyan, A. M., Borisov, V. B., Novoderezhkin, V. I., Ghaim, J., Zhang, J., et al. (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.
 78. 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.
 79. 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.
 80. 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.
 81. 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.
 82. Siletsky, S. A., Zaspá, 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.
 83. 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.
 84. 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.
 85. Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffrè, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, **56**, 265-269.
 86. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., and Giuffrè, 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.
 87. Giuffrè, 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.
 88. Giuffrè, 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.
 89. 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.
 90. 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.

91. 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.
92. Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffrè, 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.
93. Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *mBio*, **4**, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
94. Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoese, 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.
95. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.10.006.
96. Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., and Giuffrè, 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.
97. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffrè, 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.
98. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffrè, 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.
99. Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., et al. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
100. Borisov, V. B., Forte, E., Giuffrè, 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.
101. Forte, E., Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Petrosino, M., and Giuffrè, 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.
102. 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.
103. Atlung, T., and Brøndsted, L. (1994) Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase, *J. Bacteriol.*, **176**, 5414-5422, doi: 10.1128/jb.176.17.5414-5422.1994.
104. Brøndsted, L., and Atlung, T. (1996) Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cyx-appA*) operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **178**, 1556-1564, doi: 10.1128/jb.178.6.1556-1564.1996.
105. 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.
106. 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.
107. 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.
108. 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.
109. 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.
110. Petersen, L. C. (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 299-307, doi: 10.1016/0005-2728(77)90216-X.
111. Nicholls, P. (1975) The effect of sulphide on cytochrome *aa*₃. Isosteric and allosteric shifts of the reduced α -peak, *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 24-35, doi: 10.1016/0005-2728(75)90186-3.
112. Cooper, C. E., and Brown, G. C. (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **40**, 533-539, doi: 10.1007/s10863-008-9166-6.
113. Rabeh, W. M., and Cook, P. F. (2004) Structure and mechanism of *O*-acetylserine sulfhydrylase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 26803-26806, doi: 10.1074/jbc.R400001200.
114. Korshunov, S., Imlay, K. R., and Imlay, J. A. (2016) The cytochrome *bd* oxidase of *Escherichia coli* prevents respiratory inhibition by endogenous and exogenous hydrogen sulfide, *Mol. Microbiol.*, **101**, 62-77, doi: 10.1111/mmi.13372.
115. Saini, V., Chinta, K. C., Reddy, V. P., Glasgow, J. N., Stein, A., et al. (2020) Hydrogen sulfide stimulates *Mycobacterium tuberculosis* respiration, growth and pathogenesis, *Nat. Commun.*, **11**, 557, doi: 10.1038/s41467-019-14132-y.
116. Nicholls, P., and Kim, J. K. (1982) Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome *c* oxidase system, *Can. J. Biochem.*, **60**, 613-623, doi: 10.1139/o82-076.
117. Nicholls, P., Petersen, L. C., Miller, M., and Hansen, F. B. (1976) Ligand-induced spectral changes in cytochrome *c* oxidase and their possible significance, *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 188-196, doi: 10.1016/0005-2728(76)90132-8.

**TERMINAL OXIDASE CYTOCHROME *bd* PROTECTS BACTERIA
AGAINST HYDROGEN SULFIDE TOXICITY****Review****V. B. Borisov^{1*} and E. Forte²**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology,
119991 Moscow, Russia; E-mail: bor@belozersky.msu.ru*

² *Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, I-00185 Rome, Italy*

Hydrogen sulfide (H₂S) is often called the third gasotransmitter (after nitric oxide and carbon monoxide), or endogenous gaseous signaling molecule. This compound plays important roles in organisms from different taxonomic groups, from bacteria to animals and humans. In mammalian cells, H₂S has a cytoprotective effect at nanomolar concentrations, but becomes cytotoxic at higher concentrations. The primary target of H₂S is mitochondria. At submicromolar concentrations, H₂S inhibits mitochondrial heme-copper cytochrome *c* oxidase, thereby blocking aerobic respiration and oxidative phosphorylation and eventually leading to cell death. Since the concentration of H₂S in the gut is extremely high, the question arises – how can gut bacteria maintain the functioning of their oxygen-dependent respiratory electron transport chains under such conditions? This review provides an answer to this question and discusses the key role of non-canonical *bd*-type terminal oxidases of the enterobacterium *Escherichia coli*, a component of the gut microbiota, in maintaining aerobic respiration and growth in the presence of toxic concentrations of H₂S in the light of recent experimental data.

Keywords: respiratory chain, terminal oxidase, heme-copper oxidase, cytochrome *bd*, heme