

ПРЕПАРАТЫ ТЕРМИНАЛЬНОЙ ОКСИДАЗЫ ЦИТОХРОМА *bd-II*, ВЫДЕЛЕННЫЕ ИЗ *Escherichia coli*, ОБНАРУЖИВАЮТ ЗНАЧИТЕЛЬНУЮ АКТИВНОСТЬ В УДАЛЕНИИ ПЕРЕКИСИ ВОДОРОДА

© 2022 Е. Форте¹, М.Р. Настаси¹, В.Б. Борисов^{2*}

¹ Римский университет Сапиенца, отдел биохимических наук,
I-00185 Рим, Италия

² НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: bor@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 05.04.2022

После доработки 29.04.2022

Принята к публикации 29.04.2022

Цитохром *bd-II* является одной из трёх терминальных хинолоксидаз аэробной дыхательной цепи *Escherichia coli*. Было показано, что препараты солиобилизированной детергентом немеченой оксидазы *bd-II*, выделенной из бактерии, с высокой скоростью удаляют перекись водорода (H_2O_2), продуцируя молекулярный кислород (O_2). Добавление H_2O_2 к тому же буферу, который не содержит фермента или содержит термически денатурированный цитохром *bd-II*, не приводит к образованию O_2 . Последнее наблюдение исключает участие в реакции посторонних переходных металлов, связанных с белком. Индуцированное H_2O_2 образование O_2 не подвержено ингибированию N-этилмалеимидом (соединение, связывающее сульфгидрильные группы), антимицином А (соединение, которое специфически связывается с местом связывания хинола) и СО (двухатомный газ, который специфически связывается с восстановленным гемом *d*). Однако образование O_2 ингибируется цианидом ($IC_{50} = 4,5 \pm 0,5$ мкМ) и азидом. Добавление H_2O_2 в присутствии дитиотреитола и убихинона-1 не инактивирует цитохром *bd-II* и, по-видимому, не влияет на O_2 -редуктазную активность фермента. Способность цитохрома *bd-II* нейтрализовать H_2O_2 может играть роль в физиологии бактерий, делая их устойчивыми к пероксид-опосредованному стрессу.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, цитохром, гем, активные формы кислорода.

DOI: 10.31857/S032097252208005X, EDN: AXMBUR

ВВЕДЕНИЕ

Аэробная дыхательная цепь *Escherichia coli* разветвлена и содержит три O_2 -зависимые хинолоксидазы: цитохром *bo_3*, представитель гем-медных оксидаз, и две оксидазы типа *bd*, *bd-I* и *bd-II*, в которых отсутствует медь [1–10]. Все три фермента восстанавливают O_2 до $2H_2O$, используя четыре электрона, полученные от двух молекул хинола [11–13], и сопрягают эту окислительно-восстановительную реакцию с образованием протонного электрохимического градиента [14–19]. Эффективность последнего процесса с цитохромом *bo_3* вдвое выше,

чем с любой из двух оксидаз *bd*-типа [14, 19]. Тем не менее при низком парциальном давлении O_2 и в других неблагоприятных условиях роста *E. coli* и некоторые другие бактерии, включая патогенные, предпочитают использовать цитохром *bd*, а не цитохром *bo_3* (или другую гем-медную оксидазу) в качестве основной терминальной дыхательной кислородредуктазы [20–23]. Было бы крайне нелогичным, если бы цитохром *bd*, помимо биоэнергетической функции, не участвовал в других процессах, жизненно важных для выживания микроорганизма [24–27]. Действительно, снижая внутриклеточную концентрацию O_2 , цитохром *bd* защищает O_2 -лабильные ферменты [28, 29]. Сообщалось, что цитохром *bd-I* *E. coli* участвует в биосинтезе гема [30] и образовании дисульфидных связей при фолдинге белка [31].

Принятые сокращения: ДТТ – дитиотреитол; Q_1 – 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохинон.

* Адресат для корреспонденции.

Кроме того, оксидаза *bd*-типа способствует защите бактерий от стрессов, вызванных антибиотиками [32], пероксинитритом [27, 33], оксидом азота [34–43], сульфидом [44–48], амиаком [49] и перекисью водорода [50–58].

За последние несколько лет были определены трёхмерные структуры *bd*-оксидаз ряда бактерий, в том числе *E. coli* [59–65]. Хотя описанные структуры обнаруживают схожее строение, они, по-видимому, различаются по количеству субъединиц и другим важным характеристикам [66]. В частности, у *E. coli* цитохром *bd*-I состоит из четырёх субъединиц: CydA, CydB, CydX и CydY. Цитохром *bd*-II содержит на одну субъединицу меньше; он состоит из трёх полипептидных цепей: AppC (гомологична CydA), AppB (гомологична CydB) и AppX (гомологична CydX). Две большие субъединицы, CydA и CydB в *bd*-I и AppC и AppB в *bd*-II, составляют структурное ядро фермента. CydA/AppC несёт три разных гема: один низкоспиновый, b_{558} , и два высокоспиновых, b_{595} и d , а также так называемую Q-петлю, непосредственно участвующую в связывании хинолового субстрата. Гем b_{558} участвует в окислении хинола. Гем d является местом связывания O_2 и его восстановления до $2H_2O$, возможно, путём последовательного образования каталитических интермедиатов A^1 , A^3 , P, F и O^1 [13, 17, 67–69]. Замечательной особенностью гема d является очень высокое сродство к O_2 и стабильность оксигенированного комплекса [70–72]. Точная роль гема b_{595} не совсем ясна. Расстояние между центральными атомами Fe гемов b_{595} и d (10,9–11,3 Å) слишком велико для образования структурного биядерного центра. В то же время расстояние между краями гемов составляет примерно 3,5–3,8 Å, т. е. между ними возможны ван-дер-ваальсовы контакты [60, 61, 64, 65]. Это подразумевает возможность очень быстрого переноса электронов между гемами, что действительно получило экспериментальное подтверждение [73]. Таким образом, хотя гем b_{595} и гем d не образуют структурный двуядерный центр, можно говорить о функциональном дигемовом центре. Последняя идея получила поддержку в спектроскопических и электрометрических исследованиях [73–88]. Структуры обоих цитохромов *bd* *E. coli* позволяют осуществлять линейную последовательность переноса электрона (хинол $\rightarrow b_{558} \rightarrow b_{595} \rightarrow d$) [66].

Цитохром *bd*-II, вторая оксидаза типа *bd* в *E. coli*, кодируется опероном *appCBX*. Его экспрессия индуцируется вступлением в стационарную фазу, фосфатным голоданием и анаэробным ростом. Цитохром *bd*-II, веро-

ятно, работает в ещё более ограниченных по кислороду условиях, чем цитохром *bd*-I (см. [7] и ссылки в ней). Функция цитохрома *bd*-II неизвестна, но, по-видимому, это не просто молчащая резервная копия цитохрома *bd*-I. Сообщалось, что поток электронов через цитохром *bd*-II весьма значителен [89, 90]. Rivera-Chavez et al. [91] обнаружили, что цитохром *bd*-II является основным фактором, вызывающим раннюю после приёма антибиотика экспансию сальмонелл в полости кишечника. *S. enterica* серовар *Typhimurium* является основной причиной гастроэнтерита у человека, и его хромосома, как и у *E. coli*, кодирует две оксидазы *bd*-типа – *bd*-I и *bd*-II. Лечение стрептомицином вызывает инактивацию комменсальных, продуцирующих бутират *Clostridia* из кишечной микробиоты мышей, что, в свою очередь, приводит к снижению уровня бутирата, увеличению снабжения кислородом эпителия и аэробной экспансии *S. typhimurium* [91]. Было показано [91], что цитохром *bd*-II усиливает экспансию в кишечнике *S. typhimurium* и необходим для фекально-оральной передачи. Авторы пришли к выводу [91], что цитохром *bd*-I способствует только росту *S. typhimurium* в ткани хозяина, тогда как цитохром *bd*-II требуется исключительно для роста бактерий в условиях более ограниченного содержания O_2 , встречающихся в обработанном стрептомицином кишечнике. Кроме того, недавно Chanin et al. [92] высказали предположение о роли аэробного дыхания, опосредованного цитохромом *bd*-II *E. coli*, в развитии воспаления кишечника. Используя химические и генетические модели колита на мышах, авторы обнаружили, что оксидаза *bd*-II обеспечивает *E. coli* преимущество в приспособляемости во время анаэробного роста в присутствии H_2O_2 [92]. Таким образом, поиск новых потенциальных функций цитохрома *bd*-II может быть полезен для углубления нашего понимания не только молекулярных механизмов действия фермента, но и патофизиологии бактериальной инфекции.

Ранее мы сообщали, что цитохром *bd*-I *E. coli* проявляет значительную каталазоподобную активность, разлагая H_2O_2 до O_2 , что может служить дополнительной бактериальной защитой от окислительного стресса [55]. Совсем недавно мы обнаружили, что препараты цитохрома *bd*-II, выделенные из *E. coli*, также проявляют каталазоподобную активность, устойчивую к NO, но чувствительную к окислительно-восстановительному состоянию фермента (см. рис. 5 в обзорной статье Borisov et al. [58]). Это открытие вдохновило нас на более подробное изучение активности препаратов *bd*-II.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы и выделение фермента. В работе использовали следующие реактивы: DT-диафороза крысы, дитиотреитол (DTT), 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохинон (убихинон-1 или Q_1), додецил- β -D-мальтозид и N-лауроил-саркозин («Sigma-Aldrich», США); 30%-ный раствор H_2O_2 («Fluka», Швейцария), его концентрацию определяли спектрофотометрически с использованием $\epsilon_{240} = 43,6 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Исходный раствор CO («Air Liquide», Франция) был получен путём уравнивания дегазированной воды с чистым газом при 1 атм при комнатной температуре с получением 1 mM раствора CO. Цитохром *bd-II* из штамма *E. coli* MB37 (BW25113 $\Delta cyoB \Delta cydB \Delta nuoB$, маркер канамицина удалён) был выделен, как описано ранее [19]. Выделение цитохрома *bd-I* из штамма *E. coli* GO105/pTK1 проводили, как сообщалось в более ранних работах [82,

93]. Концентрацию фермента определяли из его разностного спектра поглощения (восстановленный дитионитом минус исходный), используя значение $\Delta\epsilon_{628-607} = 10,8 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ [77].

Методы измерения и условия анализа. Полярографические измерения O_2 проводились с использованием респирометра с высоким разрешением Oxygraph-2k («Oroboros Instruments», Австрия). Каталазоподобную активность выделенного и солюбилизованного цитохрома *bd-II* из *E. coli* оценивали полярографически по увеличению давления O_2 после добавления H_2O_2 к раствору фермента. За потреблением NADH следили по изменению поглощения при 340 нм с помощью спектрофотометра Agilent Cary 60 UV-Vis («Agilent», США). Измерения проводили при 25 °C в 50 mM Na/фосфатном буфере (pH 7,0), содержащем 0,1 mM ЭДТА, с добавлением либо 0,02% додецил- β -D-мальтозида (цитохром *bd-II*), либо 0,05% N-лауроил-саркозина (цитохром *bd-I*).

Анализ данных проводили с помощью пакета программ Origin («OriginLab Corporation», США). Кажущаяся IC_{50} NaCN для каталазоподобной активности цитохрома *bd-II* была получена путём построения графика зависимости процента ингибирования фермента от концентрации NaCN и введением данных в уравнение Хилла [94], предполагая, что коэффициент Хилла $n = 1$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

В этой работе мы использовали штамм *E. coli* MB37, поскольку он содержит цитохром *bd-II* в качестве единственной терминальной оксидазы. Цитохромы *bd-I* и *bo3* в этом штамме отсутствуют. Это удобно, поскольку позволяет нам получать препараты цитохрома *bd-II* без примеси других терминальных оксидаз.

На рис. 1, *a* показано, что добавление H_2O_2 к дегазированному ($<15 \text{ мкМ } O_2$) буферу, содержащему выделенный цитохром *bd-II*, приводит к образованию O_2 . Генерации O_2 после добавления H_2O_2 не зарегистрировано в случае отсутствия фермента (не показано) или его термической инактивации 10-минутным кипячением при 100 °C (рис. 1, *a*). Последнее наблюдение позволяет предполагать, что наблюдаемая активность обусловлена не посторонними переходными металлами в препарате фермента, а связана с нативным белком. Реакция протекает с образованием половины моля O_2 на моль добавленного H_2O_2 (рис. 1, *б*). Скорости реакции, измеренные в микроаэробных ($<15 \text{ мкМ } O_2$) и аэробных ($\sim 255 \text{ мкМ } O_2$)

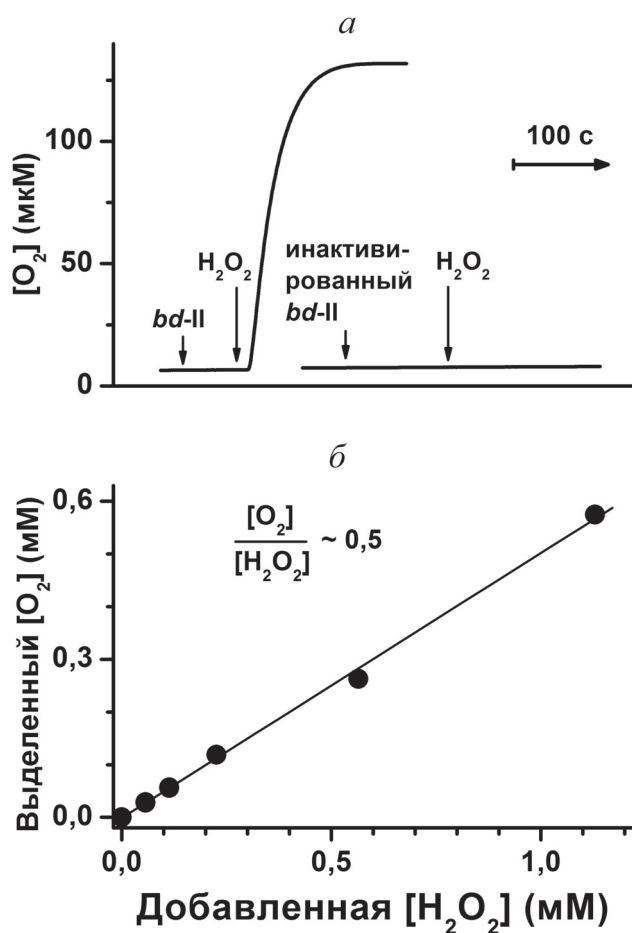


Рис. 1. Каталазоподобная активность выделенного цитохрома *bd-II* *E. coli*. *a* – Выделение O_2 , индуцированное добавлением 225 мкМ H_2O_2 к ферменту в микроаэробных условиях. Кривая изменения концентрации O_2 в присутствии фермента, подвергнутого тепловой инактивации, приведена в качестве контроля. *б* – Количество O_2 , образующееся после добавления увеличивающихся количеств H_2O_2 к выделенному цитохрому *bd-II*. Концентрация фермента – 50 нМ

условиях, оказались очень похожими (не показано). Это позволяет сделать вывод, что O_2 , по-видимому, не является ингибитором каталазоподобной активности.

Были изучены зависимости начальной скорости реакции от концентрации фермента и субстрата (H_2O_2). Было обнаружено, что скорость образования O_2 линейно увеличивается с ростом концентрации цитохрома *bd-II* в диапазоне 0–0,2 мкМ (рис. 2). Как и в случае с цитохромом *bd-I* [55], каталазоподобная реакция, осуществляемая при участии цитохрома *bd-II*, ускорялась при повышении концентрации H_2O_2 примерно до 0,5 мМ, но при более высокой концентрации H_2O_2 было видно, что скорость уже достигла предела (рис. 3). При аппроксимации зависимости уравнением Михаэлиса–Ментен были получены кажущиеся значения $k_{cat} = 1029,9 \pm 63,2 \text{ с}^{-1}$ и $K_M = 3,94 \pm 0,54 \text{ мМ}$ (рис. 3). Для сравнения, анализ той же зависимости для цитохрома *bd-I* даёт $k_{cat} = 164,9 \pm 8,9 \text{ с}^{-1}$ и $K_M = 1,69 \pm 0,29 \text{ мМ}$ (рис. 3).

В присутствии DTT и Q_1 цитохром *bd-II* не инактивируется перекисью. Фермент сохраняет O_2 -редуктазную активность (>90% от исход-

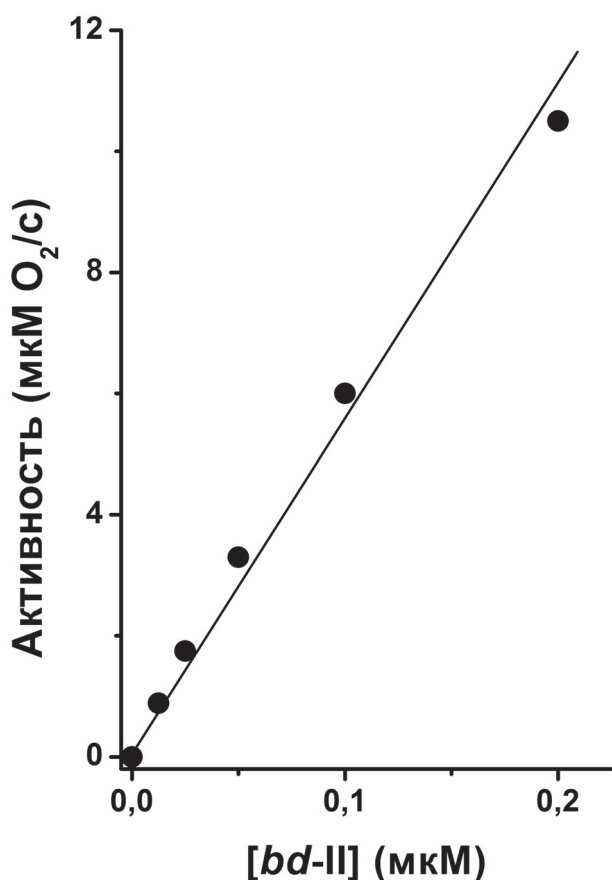


Рис. 2. Зависимость скорости выделения O_2 от концентрации цитохрома *bd-II*. Концентрация H_2O_2 – 225 мкМ

ного уровня) даже после трёх последовательных добавлений H_2O_2 (рис. 4).

Чтобы понять, конкурируют ли каталазоподобная и оксидазная активности цитохрома *bd-II* друг с другом, мы изучили влияние H_2O_2 на хинол: O_2 -оксидоредуктазную активность цитохрома *bd-II*, измеренную спектрофотометрически путём мониторинга (при 340 нм) потребления NADH в присутствии NADH:хинон-оксидоредуктазы (DT-диафоразы) и Q_1 . На рис. 5 показано, что добавление H_2O_2 не влияет на O_2 -редуктазную активность цитохрома *bd-II*. Поскольку гем *d* является сайтом, в котором происходит восстановление O_2 до $2H_2O$ [12], участие этого хлоринового кофактора в каталазоподобной реакции маловероятно.

Чтобы выявить в цитохроме *bd-II* сайт, который мог бы отвечать за наблюдаемую каталазоподобную активность, мы протестировали

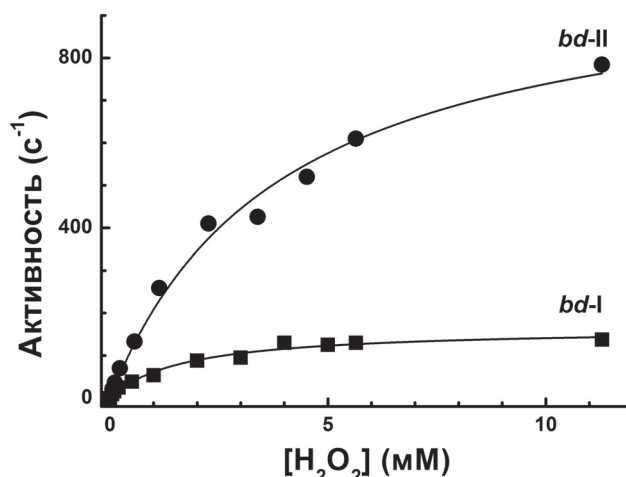


Рис. 3. Зависимость начальных скоростей образования O_2 , катализируемого цитохромами *bd-I* и *bd-II*, от концентрации H_2O_2 . Экспериментальные данные были аппроксимированы уравнением Михаэлиса–Ментен. Концентрации цитохромов *bd-II* и *bd-I* – 50 нМ и 100 нМ соответственно

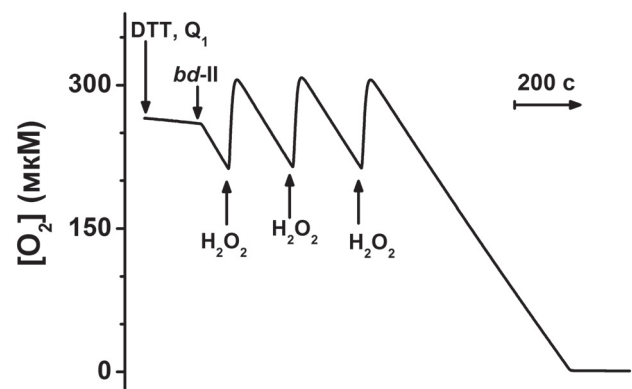


Рис. 4. Влияние последовательных добавок H_2O_2 на хинол: O_2 -оксидоредуктазную активность цитохрома *bd-II*, измеренную амперометрически. Концентрации: фермент – 100 нМ; DTT – 10 мМ; Q_1 – 3 мкМ; H_2O_2 – 200 мкМ (при каждом добавлении)

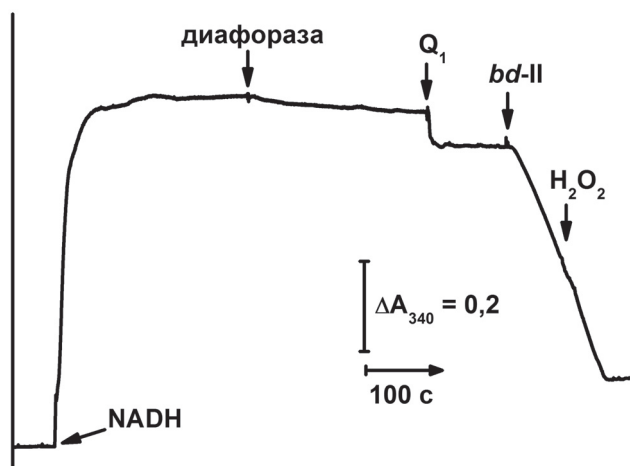


Рис. 5. Влияние H₂O₂ на хинол:O₂-оксидоредуктазную активность цитохрома *bd-II*, измеренную спектрофотометрически после окисления NADH в присутствии DT-диафоразы и Q₁. Концентрации: фермент – 1,28 нМ; NADH – 250 мкМ; DT-диафораза – 6,7 мкг/мл; Q₁ – 20 мкМ; H₂O₂ – 530 мкМ

несколько ингибиторов с различным механизмом действия. N-этилмалеимид в концентрации 20 мкМ не влиял на каталазоподобную активность (таблица), что, скорее всего, исключает участие в реакции тиоловых групп белка.

Было обнаружено, что антимицин А, мишенью которого является сайт связывания хинола, неэффективен при ингибировании каталазоподобной активности даже при концентрации 167 мкМ (таблица). Окисленный Q₁ в концентрации 250 мкМ также не влиял на эту активность (таблица).

Отсутствие ингибирующих эффектов антимицина А и Q₁ позволяет предположить, что сайт связывания хинола в цитохроме *bd-II* не

участвует в каталазоподобной реакции. В свете этого открытия обмен электронами (перенос электронов внутри белка) между сайтом связывания хинола и гемовыми сайтами в ходе каталазоподобной реакции также может быть исключен.

СО (2 мкМ), воздействующий на восстановленный гем *d* [95], также не влиял на каталазоподобную активность (таблица). Этот результат является дополнительным доказательством того, что гем *d* практически не участвует в реакции.

В отличие от ингибиторов, описанных выше, цианид и азид, обычно нацеленные на высокоспиновый окисленный гем, очевидно, влияют на каталазоподобную активность цитохрома *bd-II* (таблица, рис. 6, а). Эти лиганды могут связываться с вакантным шестым положением в координационной структуре иона железа высокоспинового гема или замещать его слабо координированный шестой аксиальный лиганд, если он присутствует. Оксидазы *bd*-типа несут два высокоспиновых гема, *b*₅₉₅ и *d*. Ингибирующий эффект может быть обусловлен двумя причинами: (1) фиксацией атома железа в окисленном состоянии, что предотвращает окислительно-восстановительное превращение гема, если роль гема заключается в том, чтобы принимать электрон в ходе одной или нескольких промежуточных стадий каталазоподобной реакции; (2) образованием комплекса гема с цианидом или азидом, что непосредственно предотвращало бы связывание молекулы перекиси водорода с атомом железа гема, необходимое для осуществления каталазоподобной реакции.

Влияние ингибиторов на каталазоподобную активность выделенных цитохромов *bd-II* и *bd-I* *E. coli*

Ингибитор	Концентрация ингибитора (мкМ)	Цитохром <i>bd-II</i>	Цитохром <i>bd-I</i>
NaCN	0–1000	+ (<i>IC</i> ₅₀ = 4,5 ± 0,5 мкМ)	+ (<i>IC</i> ₅₀ = 2,4 ± 0,3 мкМ)
NaN ₃	100	+ (35% ^а)	+ (98% ^а)
Оксид азота (NO)	20	–	–
Оксид углерода (CO)	2	–	–
Антимицин А	167	–	–
Убихинон-1 (Q ₁)	250	–	–
N-Этилмалеимид	20	–	–

Примечание. «+» означает, что ингибитор влияет на каталазоподобную активность; «–» означает отсутствие ингибирующего эффекта. Данные по цитохрому *bd-I* были взяты из статьи Borisov et al. [55]. Данные о влиянии NO на каталазоподобную активность цитохрома *bd-II* были взяты из обзорной статьи Borisov et al. [58]. Другие данные по цитохрому *bd-II* были получены в ходе данного исследования.

^а % Ингибирования каталазоподобной активности.

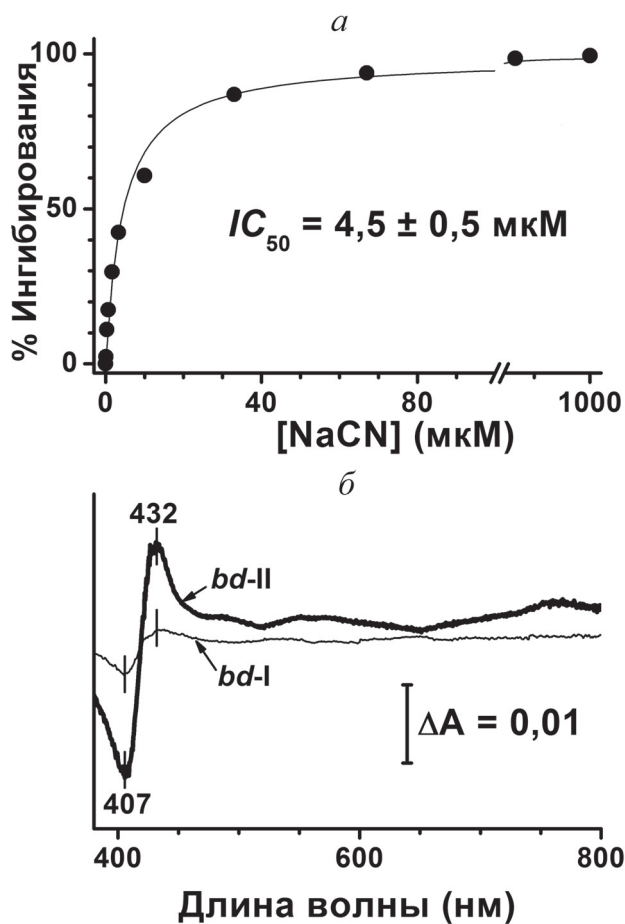


Рис. 6. Взаимодействие выделенного цитохрома *bd-II* с цианидом. *a* – Процент ингибирования каталазоподобной активности цитохрома *bd-II*, измеренный при повышении концентрации NaCN в диапазоне 0–1000 мкМ. Фермент (50 нМ) предварительно инкубировали в течение 1 мин с NaCN в разных концентрациях (от 0 до 1000 мкМ), затем добавляли 225 мкМ H_2O_2 . *б* – Сравнение спектральных изменений, вызванных добавлением цианида к цитохрому *bd-II* (толстая линия) и цитохрому *bd-I* (тонкая линия). Разностные спектры поглощения регистрировали после добавления 50 мкМ NaCN к 2 мкМ фермента (*bd-II* или *bd-I*)

Цианид ингибировал каталазоподобную реакцию цитохрома *bd-II* с кажущимся значением $IC_{50} = 4,5 \pm 0,5$ мкМ (таблица, рис. 6, *a*). Это значение лишь немного выше, чем для цитохрома *bd-I* ($IC_{50} = 2,4 \pm 0,3$ мкМ, таблица, см. также статью Vorisov et al. [55]). В то же время показано, что цианид является гораздо более слабым ингибитором O_2 -редуктазной активности цитохрома *bd-II* (1 мМ KCN ингибировал 89% активности оксидазы [96]). Считается, что цианид ингибирует кислородредуктазную активность цитохрома *bd* посредством связывания с гемом *d*, тем самым предотвращая взаимодействие гема *d* с молекулярным кислородом с последующим восстановлением O_2 до воды [12, 97]. Следовательно, высокая чувствительность каталазоподобной актив-

ности цитохрома *bd-II* к цианиду, очевидно, предполагает, что в реакции может участвовать какой-то другой высокоспиновый гем, отличный от гема *d*. Азид также ингибировал каталазоподобную активность цитохрома *bd-II*, хотя и менее эффективно, чем в случае цитохрома *bd-I*. Как показано в таблице, 100 мкМ NaN_3 ингибировал активность *bd-II* на 35%, но при этом на 98% ингибировал активность *bd-I*. Для практически полного (98,5%) ингибирования каталазоподобной активности цитохрома *bd-II* был необходим NaN_3 в концентрации 0,5 мМ (не показано).

Как показано выше, существует ряд данных, которые свидетельствуют против участия гема *d* в качестве сайта, ответственного за наблюдаемую каталазоподобную активность. Вероятным кандидатом на эту роль может быть высокоспиновый гем b_{595} . Этот гем является пентакоординированным, имеющим Glu445 в качестве единственного аминокислотного аксиального лиганда по пятому координационному положению гемового железа [64]. По этой причине он потенциально может связывать внешний лиганд, т.е. H_2O_2 , по шестому координационному положению гемового железа. Чтобы проверить эту гипотезу, мы исследовали влияние цианида на спектр поглощения выделенного цитохрома *bd-II*. Добавление NaCN в концентрации 50 мкМ, полностью ингибирующей каталазоподобную активность, вызвало красный сдвиг полосы Soret с $\Delta A_{432-407} \sim 0,03$ ОП в спектре поглощения 2 мкМ цитохрома *bd-II* (рис. 6, *б*, толстая линия). Это может отражать связывание цианида с высокоспиновым гемом *b*-типа в части (~15%) макромолекул цитохрома *bd-II* при условии, что $\Delta \epsilon$ составляет $\sim 100 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ и что одна молекула цианида связывается с одной молекулой фермента при ингибировании его активности. Для сравнения, в случае цитохрома *bd-I* это значение в пять раз меньше (рис. 6, *б*, тонкая линия) и соответствует связыванию цианида с гемом *b* в ~3% макромолекул фермента.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Мы обнаружили, что препараты солиubilизированной детергентом немеченой оксидазы *bd-II*, выделенной из *E. coli*, могут разлагать H_2O_2 с высокой скоростью с образованием половины моля O_2 на моль добавленной H_2O_2 (рис. 1, *a* и *б*). Однако, когда ферментные препараты проявляют побочную активность, всегда существует вероятность того, что такая активность связана не с рассматриваемым

ферментом, а с контаминацией. В нашем случае, возможным загрязнением могло бы быть присутствие посторонних ионов переходных металлов и/или нативной каталазы. Чтобы выявить или исключить наличие такого загрязнения ферментных препаратов, мы провели ряд контрольных исследований, фактически таких же, как и с выделенным цитохромом *bd-I* [55]. Тот факт, что термическая денатурация фермента *bd-II* приводит к потере каталазоподобной активности (рис. 1, *a*), предполагает, что последняя, скорее всего, не связана с посторонними переходными металлами, а обусловлена нативным белком. Присутствие каталазы *E. coli*, загрязняющей ферментные препараты, также маловероятно. Во-первых, наблюдаемая каталазоподобная активность цитохрома *bd-II* зависит от окислительно-восстановительного состояния фермента (см. рис. 5 в обзорной статье Vorisov et al. [58]). При переходе цитохрома *bd-II* в полностью восстановленное состояние после потребления всего O₂ в реакции с избытком DTT и Q₁ каталазоподобная активность, индуцированная H₂O₂, больше не наблюдалась. Однако, если впоследствии добавить нативную каталазу, реакция возобновляется. Поскольку многие каталазы не восстанавливаются таким мощным восстановителем, как дитионит [98], даже в присутствии окислительно-восстановительного медиатора [99], весьма маловероятно, что примесь каталазы, если она присутствует, была бы редокс (DTT/Q₁)-чувствительна. Во-вторых, наблюдаемая активность устойчива к NO даже при её концентрации 20 мкМ (таблица, см. также обзорную статью Vorisov et al. [58]), тогда как было показано, что NO ингибирует нативную каталазу с K_i ~0,18 мкМ [100].

Возможно, механизм, задействуемый цитохромом *bd-II* для осуществления каталазоподобной реакции, аналогичен механизму, используемому нативными каталазами. Если это так, то реакция, происходящая в гемо-

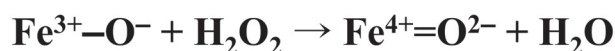
вом сайте, в простейшей форме может быть реализована как две последовательные реакции с двумя молекулами перекиси водорода. В первой реакции образуется молекула воды, а атом железа гема переходит в феррильную форму (рис. 7, *реакция 1*). Во второй реакции феррильная форма гема восстанавливается обратно в окисленное состояние, и образуется молекулярный кислород вместе с ещё одной молекулой воды (рис. 7, *реакция 2*).

Атом железа гема, вероятно, подвергается окислительно-восстановительному переходу между степенями окисления 3+ и 4+ (в случае типичных каталаз степень окисления гемового сайта формально соответствует 5+ из-за образования π-катион-радикала порфирина (например, см. [101] и ссылки в ней)). Следовательно, восстановление атома железа в геме до состояния 2+ с помощью убихинола-1 делает участие такого гема в каталазной реакции невозможным (хотя, по-видимому, не исключает возможности участия гема в пероксидазной и/или оксидазной реакции). В то же время стоит отметить, что стандартный редокс-потенциал гемовой части типичных каталаз (Fe(II)/Fe(III)) имеет довольно низкое значение (~ -0,46 В [101]), и, следовательно, в условиях опыта гипотетическая каталаза-загрязнитель, если бы она присутствовала, непременно осталась бы в окисленном состоянии и не могла бы восстановиться.

Как и в случае с цитохромом *bd-I* [55], из экспериментов с ингибиторами мы можем заключить, что ни сульфгидрильная группа, ни сайт связывания хинола, вероятно, не ответственны за каталазоподобную активность цитохрома *bd-II*.

Тот факт, что реакция сильно ингибируется цианидом (рис. 6, *a* и таблица), указывает на то, что она связана с гемовой частью. Это может быть один из двух высокоспиновых гемов, гем *d* или гем *b*₅₉₅. Как упоминалось выше, атомы гемового железа при восстановлении

Реакция 1



Реакция 2

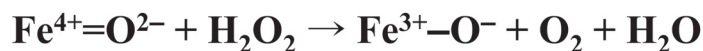


Рис. 7. Возможный механизм удаления H₂O₂ цитохромом *bd-II*

переходят в восстановленное состояние (степень окисления 2+), что, в принципе, не происходит в каталитическом цикле каталаз. Напротив, цианид связывается с атомом гемового железа в степени окисления 3+. Образование комплекса с цианидом фиксирует гемовое железо в окисленном состоянии, что является, по сути, одним из промежуточных состояний каталазного каталитического цикла. Другими словами, цианид препятствует дальнейшему продвижению фермента по каталитическому циклу каталазоподобной реакции. Мы предполагаем, что участие гема *d* маловероятно, учитывая результаты, что наблюдаемая активность нечувствительна к NO и CO (таблица), и, по-видимому, не мешает реакции восстановления O₂ (рис. 5), протекающей на геме *d*. В то же время известно, что гем *b*₅₉₅ гораздо менее чувствителен к NO и CO, чем гем *d* [77]. Таким образом, гем *b*₅₉₅ был бы разумным кандидатом. Кстати, его спектр поглощения напоминает спектры поглощения каталаз и пероксидаз, имеющих в качестве кофактора протогем IX [83].

Для каталазоподобной реакции цитохрома *bd*-II определили кажущиеся значения $k_{\text{cat}} \sim 1030 \text{ с}^{-1}$ и $K_{\text{M}} \sim 4 \text{ мМ}$. Однако, судя по спектру связывания цианида с цитохромом *bd*-II (рис. 6, б), в реакции участвует только ~15% от общего количества фермента. В этом случае значение k_{cat} следует скорректировать до ~6860 с⁻¹. Это позволяет оценить значение $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ как $\sim 1,7 \times 10^6 \text{ М}^{-1}\text{с}^{-1}$. Для цитохрома *bd*-I пересчитанные параметры k_{cat} и $k_{\text{cat}}/K_{\text{M}}$ должны составлять ~5500 с⁻¹ и $3,2 \times 10^6 \text{ М}^{-1} \text{ с}^{-1}$ соответственно, если предположить, что в реакцию вовлечено лишь ~3% всей оксидазы.

Что касается каталазоподобной активности цитохрома *bd*-I, обнаруженной ранее [55], стоит упомянуть сообщение Al-Attar et al. [57] о том, что препарат выделенного цитохрома *bd*-I с гистидиновой меткой не обладает каталазоподобной активностью, но проявляет беспрецедентно высокую хинолпероксидазную активность. Это наблюдение, очевидно, не согласуется с данными, представленными Borisov et al. [55], что, помимо изолированного немеченого цитохрома *bd*-I, каталазоподобная

активность также обнаруживается в мутантном штамме *E. coli* (UM2), лишённом каталаз *katE* и *katG*, при сверхэкспрессии оксидазы *bd*-I (немодифицированной). Это несоответствие подробно обсуждается в статье Forte et al. [21]. Для разрешения этого несоответствия необходимы дополнительные исследования.

В заключение, в данной работе с использованием различных контролей и ингибиторов показано, что препараты солиобилизованного детергентом немеченого цитохрома *bd*-II *E. coli* способны быстро разлагать перекись водорода с образованием молекулярного кислорода. Вклад цитохрома *bd*-II в механизмы детоксикации H₂O₂ *in vivo* ещё предстоит установить.

Вклад авторов. Е.Ф. и В.Б.Б. задумали исследование, разработали план эксперимента и написали статью. Е.Ф., М.Р.Н. и В.Б.Б. провели и проанализировали эксперименты. Все авторы рассмотрели результаты, внесли свой вклад в интерпретацию данных и критическую доработку рукописи, а также одобрили окончательную версию рукописи.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 22-24-00045; <https://rscf.ru/project/22-24-00045/>).

Благодарность. Авторы выражают благодарность М. Беккеру (Амстердамский университет, Амстердам, Нидерланды) за предоставление штамма *E. coli* MB37 и Р. Б. Геннису (Иллинойский университет, Урбана, Иллинойс, США) за штамм *E. coli* GO105/pTK1. В.Б. Борисов также хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность А.Д. Виноградову (безвременно ушедшему), учителю автора со студенческой скамьи до защиты докторской диссертации.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой или какой-либо другой сфере.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит никаких исследований с участием людей или животных, проведённых кем-либо из авторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 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.
- Poole, R. K., and Cook, G. M. (2000) Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons

- and regulation, *Adv. Microb. Physiol.*, **43**, 165-224, doi: 10.1016/S0065-2911(00)43005-5.
3. Murali, R., Gennis, R. B., and Hemp, J. (2021) Evolution of the cytochrome *bd* oxygen reductase superfamily and the function of CydAA³ in Archaea, *ISME J.*, doi: 10.1038/s41396-021-01019-4.
 4. 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.
 5. Borisov, V. B. (2004) Mutations in respiratory chain complexes and human diseases, *Ital. J. Biochem.*, **53**, 34-40.
 6. 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.
 7. Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
 8. 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.
 9. 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.
 10. Forte, E., Giuffre, A., Huang, L. S., Berry, E. A., and Borisov, V. B. (2020) Nitric oxide does not inhibit but is metabolized by the cytochrome *bcc-aa₃* supercomplex, *Int. J. Mol. Sci.*, **21**, 8521, doi:10.3390/ijms21228521.
 11. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: Structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
 12. 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.
 13. Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) Proton pumping and non-pumping terminal respiratory oxidases: active sites intermediates of these molecular machines and their derivatives, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10852, doi: 10.3390/ijms221910852.
 14. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
 15. Jasaitis, A., Borisov, V. B., Belevich, N. P., Morgan, J. E., Konstantinov, A. A., et al. (2000) Electrogenic reactions of cytochrome *bd*, *Biochemistry*, **39**, 13800-13809, doi: 10.1021/bi001165n.
 16. Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., et al. (2005) Time-resolved electrometric and optical studies on cytochrome *bd* suggest a mechanism of electron-proton coupling in the di-heme active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3657-3662, doi: 10.1073/pnas.0405683102.
 17. Belevich, I., Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2007) Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28514-28519, doi: 10.1074/jbc.M705562200.
 18. Borisov, V. B., Belevich, I., Bloch, D. A., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2008) Glutamate 107 in subunit I of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* is part of a transmembrane intraprotein pathway conducting protons from the cytoplasm to the heme *b₅₉₅*/heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907-7914, doi: 10.1021/bi800435a.
 19. 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.
 20. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., et al. (2021) Bacterial oxidases of the cytochrome *bd* family: redox enzymes of unique structure, function and utility as drug targets, *Antioxid. Redox Signal.*, **34**, 1280-1318, doi: 10.1089/ars.2020.8039.
 21. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffre, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171-234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
 22. 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.
 23. Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., et al. (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.
 24. Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffre, A., et al. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, **56**, 265-269.
 25. Giuffre, A., Borisov, V. B., Mastronicola, D., Sarti, P., and Forte, E. (2012) Cytochrome *bd* oxidase and nitric oxide: from reaction mechanisms to bacterial physiology, *FEBS Lett.*, **586**, 622-629, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.035.
 26. Giuffre, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1178-1187, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.01.016.
 27. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., et al. (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.
 28. Poole, R. K., and Hill, S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* – roles of the terminal oxidases, *Biosci. Rep.*, **17**, 307-317, doi: 10.1023/A:1027336712748.
 29. Bertsova, Y. V., Demin, O. V., and Bogachev, A. V. (2005) Respiratory protection of nitrogenase complex

- in *Azotobacter vinelandii* [in Russian], *Usp. Biol. Khim.*, **45**, 205-234.
30. Mobius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hannig, A. L., Riedmann, K., et al. (2010) Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10436-10441, doi: 10.1073/pnas.1000956107.
 31. Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., and Bardwell, J. C. A. (1999) Oxidative protein folding is driven by the electron transport system, *Cell*, **98**, 217-227, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81016-8.
 32. Lu, P., Heineke, M. H., Koul, A., Andries, K., Cook, G. M., et al. (2015) The cytochrome *bd*-type quinol oxidase is important for survival of *Mycobacterium smegmatis* under peroxide and antibiotic-induced stress, *Sci. Rep.*, **5**, 10333, doi: 10.1038/srep10333.
 33. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxyxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.10.006.
 34. Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., et al. (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.
 35. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., et al. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu_B-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, **580**, 4823-4826, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.072.
 36. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., et al. (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.
 37. 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.
 38. Borisov, V. B., Forte, E., Giuffre, A., Konstantinov, A., and Sarti, P. (2009) Reaction of nitric oxide with the oxidized di-heme and heme-copper oxygen-reducing centers of terminal oxidases: different reaction pathways and end-products, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1185-1187, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.06.002.
 39. Shepherd, M., Achard, M. E., Idris, A., Totsika, M., Phan, M. D., et al. (2016) The cytochrome *bd*-I respiratory oxidase augments survival of multidrug-resistant *Escherichia coli* during infection, *Sci. Rep.*, **6**, 35285, doi: 10.1038/srep35285.
 40. Holyoake, L. V., Hunt, S., Sanguinetti, G., Cook, G. M., Howard, M. J., et al. (2016) CydDC-mediated reductant export in *Escherichia coli* controls the transcriptional wiring of energy metabolism and combats nitrosative stress, *Biochem. J.*, **473**, 693-701, doi: 10.1042/BJ20150536.
 41. Jones-Carson, J., Husain, M., Liu, L., Orlicky, D. J., and Vazquez-Torres, A. (2016) Cytochrome *bd*-dependent bioenergetics and antinitrosative defenses in *Salmonella* pathogenesis, *MBio*, **7**, e02052-02016, doi: 10.1128/mBio.02052-16.
 42. Meng, Q., Yin, J., Jin, M., and Gao, H. (2018) Distinct nitrite and nitric oxide physiologies in *Escherichia coli* and *Shewanella oneidensis*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **84**, e00559-00518, doi: 10.1128/AEM.00559-18.
 43. Beebout, C. J., Eberly, A. R., Werby, S. H., Reasoner, S. A., Brannon, J. R., et al. (2019) Respiratory heterogeneity shapes biofilm formation and host colonization in uropathogenic *Escherichia coli*, *MBio*, **10**, doi: 10.1128/mBio.02400-18.
 44. Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., et al. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
 45. 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.
 46. Forte, E., and Giuffre, A. (2016) How bacteria breathe in hydrogen sulphide-rich environments, *The Biochemist*, **38**, 8-11, doi: 10.1042/BIO03805008.
 47. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Terminal oxidase cytochrome *bd* protects bacteria against hydrogen sulfide toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 22-32, doi: 10.1134/S000629792101003X.
 48. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Impact of hydrogen sulfide on mitochondrial and bacterial bioenergetics, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12688, doi: 10.3390/ijms222312688.
 49. Forte, E., Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) In *Escherichia coli* ammonia inhibits cytochrome *bo*₃ but activates cytochrome *bd*-I, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 13, doi: 10.3390/antiox10010013.
 50. 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.
 51. 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.
 52. Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R. K., and Cook, G. M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 23-31, doi: 10.1023/a:1002779201379.
 53. Korshunov, S., and Imlay, J. A. (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **75**, 1389-1401, doi: 10.1111/j.1365-2958.2010.07059.x.
 54. 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.
 55. Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., et al. (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.

56. Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., et al. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
57. Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoerer, J., Friedrich, T., et al. (2016) Cytochrome *bd* displays significant quinol peroxidase activity, *Sci. Rep.*, **6**, 27631, doi: 10.1038/srep27631.
58. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., and Forte, E. (2021) ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/antiox10060839.
59. Safarian, S., Rajendran, C., Muller, 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, doi: 10.1126/science.aaf2477.
60. 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.
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. Wang, W., Gao, Y., Tang, Y., Zhou, X., Lai, Y., et al. (2021) Cryo-EM structure of mycobacterial cytochrome *bd* reveals two oxygen access channels, *Nat. Commun.*, **12**, 4621, doi: 10.1038/s41467-021-24924-w.
63. Safarian, S., Opel-Reading, H. K., Wu, D., Mehdipour, A. R., Hards, K., et al. (2021) The cryo-EM structure of the *bd* oxidase from *M. tuberculosis* reveals a unique structural framework and enables rational drug design to combat TB, *Nat. Commun.*, **12**, 5236, doi: 10.1038/s41467-021-25537-z.
64. Grauel, A., Kagi, J., Rasmussen, T., Makarchuk, I., Oppermann, S., et al. (2021) Structure of *Escherichia coli* cytochrome *bd*-II type oxidase with bound aurachin D, *Nat. Commun.*, **12**, 6498, doi: 10.1038/s41467-021-26835-2.
65. Grund, T. N., Radloff, M., Wu, D., Goojani, H. G., Witte, L. F., et al. (2021) Mechanistic and structural diversity between cytochrome *bd* isoforms of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2114013118, doi: 10.1073/pnas.2114013118.
66. Friedrich, T., Wohlwend, D., and Borisov, V. B. (2022) Recent advances in structural studies of cytochrome *bd* and its potential application as a drug target, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3166, doi: 10.3390/ijms23063166.
67. 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.
68. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffre, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.007.
69. Paulus, A., Rossius, S. G., Dijk, M., and de Vries, S. (2012) Oxoferryl-porphyrin radical catalytic intermediate in cytochrome *bd* oxidases protects cells from formation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830-8838, doi: 10.1074/jbc.M111.333542.
70. D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1996) The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has an extremely high oxygen affinity and two-oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition, *Microbiology*, **142**, 755-763, doi: 10.1099/00221287-142-4-755.
71. Belevich, I., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2005) Oxygenated complex of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*: stability and photolability, *FEBS Lett.*, **579**, 4567-4570, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.011.
72. 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.
73. 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.
74. 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.
75. Muntyan, M. S., Bloch, D. A., Drachev, L. A., and Skulachev, V. P. (1993) Kinetics of CO binding to putative Na⁺-motive oxidases of the *o*-type from *Bacillus FTU* and of the *d*-type from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **327**, 347-350, doi: 10.1016/0014-5793(93)81018-u.
76. 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.
77. 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.
78. 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.
79. 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.

80. 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.
81. 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.
82. 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.
83. 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.
84. 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.
85. 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.
86. 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.
87. 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.
88. 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.
89. Bekker, M., de Vries, S., Ter Beek, A., Hellingwerf, K. J., and de Mattos, M. J. (2009) Respiration of *Escherichia coli* can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome *bd*-II oxidase, *J. Bacteriol.*, **191**, 5510-5517, doi: 10.1128/JB.00562-09.
90. Shepherd, M., Sanguinetti, G., Cook, G. M., and Poole, R. K. (2010) Compensations for diminished terminal oxidase activity in *Escherichia coli*: cytochrome *bd*-II-mediated respiration and glutamate metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 18464-18472, doi: 10.1074/jbc.M110.118448.
91. Rivera-Chavez, F., Zhang, L. F., Faber, F., Lopez, C. A., Byndloss, M. X., et al. (2016) Depletion of butyrate-producing *Clostridia* from the gut microbiota drives an aerobic luminal expansion of *Salmonella*, *Cell Host Microbe*, **19**, 443-454, doi: 10.1016/j.chom.2016.03.004.
92. Chanin, R. B., Winter, M. G., Spiga, L., Hughes, E. R., Zhu, W., et al. (2020) Epithelial-derived reactive oxygen species enable AppBCX-mediated aerobic respiration of *Escherichia coli* during intestinal inflammation, *Cell Host Microbe*, **28**, 780-788.e785, doi: 10.1016/j.chom.2020.09.005.
93. Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1986) Purification and reconstitution of the cytochrome *d* terminal oxidase complex from *Escherichia coli*, *Methods Enzymol.*, **126**, 87-94, doi: 10.1016/s0076-6879(86)26011-5.
94. Goutelle, S., Maurin, M., Rougier, F., Barbaut, X., Bourguignon, L., et al. (2008) The Hill equation: A review of its capabilities in pharmacological modelling, *Fundam. Clin. Pharmacol.*, **22**, 633-648, doi: 10.1111/j.1472-8206.2008.00633.x.
95. 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.
96. Sturr, M. G., Krulwich, T. A., and Hicks, D. B. (1996) Purification of a cytochrome *bd* terminal oxidase encoded by the *Escherichia coli* *app* locus from a Δ *cyo* Δ *cyd* strain complemented by genes from *Bacillus firmus* OF4, *J. Bacteriol.*, **178**, 1742-1749, doi: 10.1128/jb.178.6.1742-1749.1996.
97. 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.
98. Deisseroth, A., and Dounce, A. L. (1970) Catalase: Physical and chemical properties, mechanism of catalysis, and physiological role, *Physiol. Rev.*, **50**, 319-375, doi: 10.1152/physrev.1970.50.3.319.
99. Su, S., Panmanee, W., Wilson, J. J., Mahtani, H. K., Li, Q., et al. (2014) Catalase (KatA) plays a role in protection against anaerobic nitric oxide in *Pseudomonas aeruginosa*, *PLoS One*, **9**, e91813, doi: 10.1371/journal.pone.0091813.
100. Brown, G. C. (1995) Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide, *Eur. J. Biochem.*, **232**, 188-191, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20798.x.
101. Lu, H., Li, Z., and Hu, N. (2003) Direct voltammetry and electrocatalytic properties of catalase incorporated in polyacrylamide hydrogel films, *Biophys. Chem.*, **104**, 623-632, doi: 10.1016/S0301-4622(03)00121-2.

**PREPARATIONS OF TERMINAL OXIDASE CYTOCHROME *bd-II*
ISOLATED FROM *Escherichia coli* REVEAL SIGNIFICANT
HYDROGEN PEROXIDE SCAVENGING ACTIVITY**

E. Forte¹, M. R. Nastasi¹, and V. B. Borisov^{2*}

¹ *Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, I-00185 Rome, Italy*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bor@belozersky.msu.ru*

Cytochrome *bd-II* is one of the three terminal quinol oxidases of the aerobic respiratory chain of *Escherichia coli*. Preparations of the detergent-solubilized untagged *bd-II* oxidase isolated from the bacterium were shown to scavenge hydrogen peroxide (H₂O₂) with high rate producing molecular oxygen (O₂). Addition of H₂O₂ to the same buffer that does not contain enzyme or contains thermally denatured cytochrome *bd-II* does not lead to any O₂ production. The latter observation rules out involvement of adventitious transition metals bound to the protein. The H₂O₂-induced O₂ production is not susceptible to inhibition by *N*-ethylmaleimide (the sulfhydryl binding compound), antimycin A (the compound that binds specifically to a quinol binding site), and CO (diatomic gas that binds specifically to the reduced heme *d*). However, O₂ formation is inhibited by cyanide (*IC*₅₀ = 4.5 ± 0.5 μM) and azide. Addition of H₂O₂ in the presence of dithiothreitol and ubiquinone-1 does not inactivate cytochrome *bd-II* and apparently does not affect the O₂ reductase activity of the enzyme. The ability of cytochrome *bd-II* to detoxify H₂O₂ could play a role in bacterial physiology by conferring resistance to the peroxide-mediated stress.

Keywords: respiratory chain, terminal oxidase, cytochrome, heme, reactive oxygen species