

СТРУКТУРНЫЙ ПОДХОД К ПОНИМАНИЮ ЭВОЛЮЦИИ САЙТА СВЯЗЫВАНИЯ ХИНОНА В КОМПЛЕКСЕ II

Обзор

© 2022 Е. Маклашина

University of California, Department of Biochemistry and Biophysics,
San Francisco, CA 94143, USA; e-mail: elena.maklashina@ucsf.edu

Поступила в редакцию 06.05.2022

После доработки 09.06.2022

Принята к публикации 10.06.2022

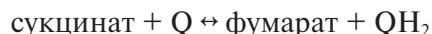
Семейство комплекса II включает мембраносвязанные сукцинат:хинонредуктазы и хинол:фумаратредуктазы, которые катализируют взаимопревращение сукцината и фумарата, сопряжённое с восстановлением и окислением хинона. Эти ферменты встречаются во всех типах биологических процессов и имеют сборную структуру, в которой высококонсервативный растворимый домен связан с прикреплённым к мембране доменом, представленным в различных вариациях. В настоящее время классификация членов семейства комплекса II основана на числе субъединиц и кофакторов, закреплённых в мембране (типы А–F). Эта классификация также даёт представление о возможных путях эволюции, позволяя предполагать, что некоторые из ферментов комплекса II (типы А–С) эволюционировали как единое целое. Происхождение типов D и F комплекса II, возможно, было результатом независимых событий в объединении *de novo* консервативного растворимого домена с новым мембранным якорем. В настоящей работе мы анализируем последние данные по структуре *Mycobacterium smegmatis* Sdh2, фермента комплекса II с двумя трансмембранными субъединицами и двумя молекулами гема *b*. Этот анализ подтверждает более раннюю гипотезу, согласно которой митохондриальный комплекс II (тип С) с единственным гемом *b*, возможно, передался как единое целое от предка, подобного Sdh2 *M. smegmatis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сукцинат:убихинонредуктаза, хинол:фумаратредуктаза, комплекс II, сайт связывания хинона, цитохром *b*.

DOI: 10.31857/S0320972522080085, **EDN:** AYLBRZ

ВВЕДЕНИЕ

Семейство ферментов комплекса II представляет собой мембраносвязанный белковый комплекс, который катализирует обратимую реакцию окисления сукцината хиноном и восстановления фумарата хинолом [1, 2]:



Ферменты находятся в бактериальных или внутренних митохондриальных мембранах, а их

гидрофильные домены содержат дикарбоксилатный активный центр, представленный в бактериальной цитоплазме или в митохондриальном матриксе. Ферменты комплекса II участвуют во всевозможных процессах и, в зависимости от предпочтительного направления катализа, их можно классифицировать как сукцинат:хинонредуктазы (SQR) или хинол:фумаратоксидоредуктазы (QFR). SQR жизненно важны для эукариот и непосредственно объединяют два основных метаболических пути, а именно цикл Кребса и аэробную дыхательную цепь. QFR, напротив, функционируют в анаэробных условиях, когда фумарат может быть использован в качестве конечного акцептора электронов. В целом, эти белковые комплексы демонстрируют высокую эволюционную адаптацию к различным внешним условиям.

Принятые сокращения: СII – комплекс II; SQR – сукцинат:хинонредуктаза; QFR – хинол:фумаратредуктаза; Q_P – проксимальный сайт связывания хинона; Q_D – дистальный сайт связывания хинона; гем *b*_P – проксимальный гем *b*; гем *b*_D – дистальный гем *b*; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия.

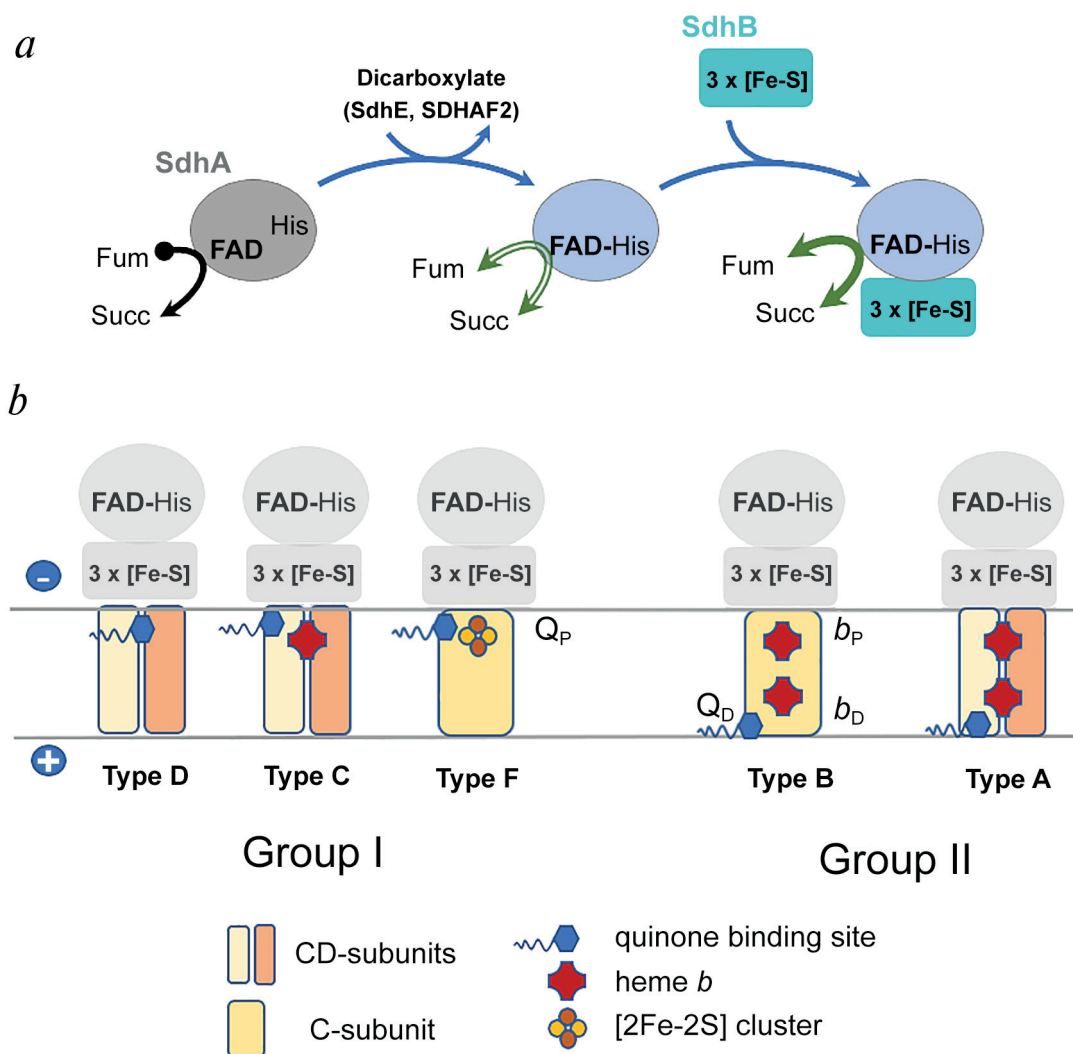


Рис. 1. Сборка растворимого АВ-домена и варианты гидрофобных доменов в ферментах комплекса II. *a* – Ковалентное присоединение FAD к связанному остатку гистидина в А-субъединице требует присутствия дикарбоксилатного лиганда и, в некоторых случаях, помощи фактора сборки. Соединение со сформированной В-субъединицей образует стабильный АВ-каталитический домен. *b* – АВ-домены сохраняются в семействе комплекса II и окрашены в серый цвет. Группа I представляет собой гидрофобный домен с проксимальным Q_p-сайтом, связывающим хинон, а группа 2 демонстрирует мембранный домен с двумя гемами *b* и дистальным Q_D-сайтом. Классификация ферментов комплекса II (типы А–F) основана на количестве субъединиц (одна или две) и количестве кофакторов (гем *b* и кластер [2Fe-2S]) в мембранном якоре, как показано на рисунке. SdhA – А-субъединица сукцинатдегидрогеназного комплекса, SdhB – В-субъединица сукцинатдегидрогеназного комплекса

СБОРКА КОМПЛЕКСА II

Ферменты комплекса II имеют значительную структурную гомологию и состоят из гидрофильных и мембранных доменов. Наибольший растворимый домен является гетеродимером и состоит из субъединицы флавопротеина (SdhA, FrdA или A), содержащей ковалентно связанный FAD и сайт связывания дикарбоксилата. Вторая, меньшая субъединица (SdhB, FrdB или B), содержит три отдельных железосерных кластера: [2Fe-2S], [4Fe-4S] и [3Fe-4S]. Кофакторы АВ-субъединиц, составляющих каталитический домен, формируются независимо в процессе сборки

комплекса II [3–5]. Включение центров Fe-S в субъединицу В происходит с использованием комплекса сборки железосерных кластеров [6, 7]. Ковалентное присоединение флавина к субъединице А у большого числа бактерий является автокаталитической реакцией, инициируемой дикарбоксилатным лигандом, связанным в каталитически активном сайте [8] (рис. 1, *a*). У эукариотов и многих прокариотов эта реакция требует дополнительного фактора сборки (называемого SdhE в *Escherichia coli* и SDHAF2 в митохондриях млекопитающих) [9–11]. До сих пор были описаны четыре фактора (SDHAF1–4), участвующие в сборке митохондриального домена SDHAB [11, 12].

Возможно, важнейшим эволюционным событием, которое привело к формированию комплекса II, является ковалентное присоединение FAD. Существует ряд гомологов отдельных субъединиц комплекса II (таких как флавоцитохром с3 фумаратредуктаза у *Shewanella sp.* и L-аспартатоксидаза у *E. coli*), которые могут использовать фумарат для окисления флавина, но не способны окислять сукцинат [13, 14]. Примечательно, что эти ферменты содержат нековалентно связанный FAD, окислительно-восстановительный потенциал которого существенно не отличается от потенциала свободного флавина ($E_m = -219$ мВ). Это делает окисление сукцината ($E_m = +30$ мВ) термодинамически невыгодным. Около 10% всех известных флавопротеинов ковалентно связаны с флавином [8]. В целом, ковалентное присоединение флавина происходит с помощью изоаллоксазинового кольца, и эта модификация значительно повышает окислительно-восстановительный потенциал флавинов. В случае СII-флавопротеинов средний потенциал ковалентно присоединенного FAD повышается примерно на 100–150 мВ в отдельных субъединицах [15] и мембрановязанных комплексах [16]. Обратимое превращение сукцината в фумарат в растворимых каталитических доменах является следствием ковалентного присоединения флавина к СII-флавопротеинам (рис. 1, а).

РАЗНООБРАЗИЕ МЕМБРАННЫХ ЯКОРЕЙ В КОМПЛЕКСЕ II

У различных видов субъединицы А и В демонстрируют высокую степень гомологии последовательности и структуры, в то время как в составе и функциях мембранных доменов существуют значительные различия. Роль гидрофобного домена в ферментах комплекса II заключается в закоривании АВ-димера и образовании каталитического сайта(ов) для второго субстрата – хинона/хинола. Как правило, мембранный якорь состоит из одной субъединицы (SdhC, FrdC или C) или двух меньших полипептидов (SdhCD, FrdCD или CD). Мембранный домен часто содержит простетические группы, такие как гем *b* или, в некоторых случаях, железосерный кластер.

Разнообразие гидрофобных доменов стало основой для классификации ферментов комплекса II [17, 18]. В этой статье мы используем ту же терминологию, что широко применяется для типов А–F, однако группируем ферменты комплекса II на основе положения

сайта связывания хинона (рис. 1, б). Группа I включает белки, у которых сайт связывания Q расположен проксимально к [3Fe-4S] в растворимом домене (Q_p-сайт). Внутри этой группы тип D представлен QFR *E. coli*, для которого была получена самая первая рентгеновская структура среди белков комплекса II [19]. Гидрофобный домен FrdCD не имеет простетических групп, а Q_p-сайт расположен в центре во взаимодействии с FrdV. Тип С представляет собой классический митохондриальный комплекс II с двумя гидрофобными субъединицами и одним гемом *b*. Для него получено большое количество рентгеновских структур, которые включают SQR *E. coli* [20], митохондриальные SQR (птиц [21] и свиней [22]), а также родохинол:фумаратредуктазу из нематоды *Ascaris suum* [23]. Недавно описанным примером F-типа является Sdh1 из *Mycobacterium smegmatis*. Первоначально этот фермент был описан как комплекс II, содержащий единственную гидрофобную субъединицу без дополнительных кофакторов [24]. Однако структура, полученная недавно с помощью криоэлектронной микроскопии, показала, что этот комплекс имеет кофактор – встроенный в мембрану кластер Риске-типа [2Fe-2S], расположенный вблизи растворимого домена [25].

Группа 2 представляет собой ферменты комплекса II, содержащие две молекулы гема *b* и Q-связывающий сайт, расположенный в дистальном положении (Q_D-сайт), у положительно заряженной стороны мембраны (рис. 1, б). Эта группа включает в себя два типа. Тип В содержит одиночную трансмембранную субъединицу и представлен структурами QFRs из *Wolinella succinogenes* [26] и *Desulfovibrio gigas* [27]. И, наконец, крио-ЭМ-структура Sdh2 *M. smegmatis* представляет собой фермент типа А, в котором мембранный домен состоит из двух гидрофобных субъединиц [28]. Структура Sdh2 также содержит дополнительную расположенную в мембране небольшую субъединицу SdhF, которую ранее не связывали с этим ферментом. В соответствии с их положением два гема *b* называют проксимальным гемом *b_p* и дистальным гемом *b_D*. Общим свойством этих дигемовых комплексов II является то, что окислительно-восстановительный потенциал гема *b* (от –45 до +75 мВ) выше, чем гема *b_D* (от –175 до –65 мВ) [18]. Поскольку прямым донором-акцептором электронов для субстрата является гем *b_D*, эти белки работают с низкопотенциальными менахинонами – как менахинол:фумаратредуктазы или сукцинат:менахинонредуктазы.

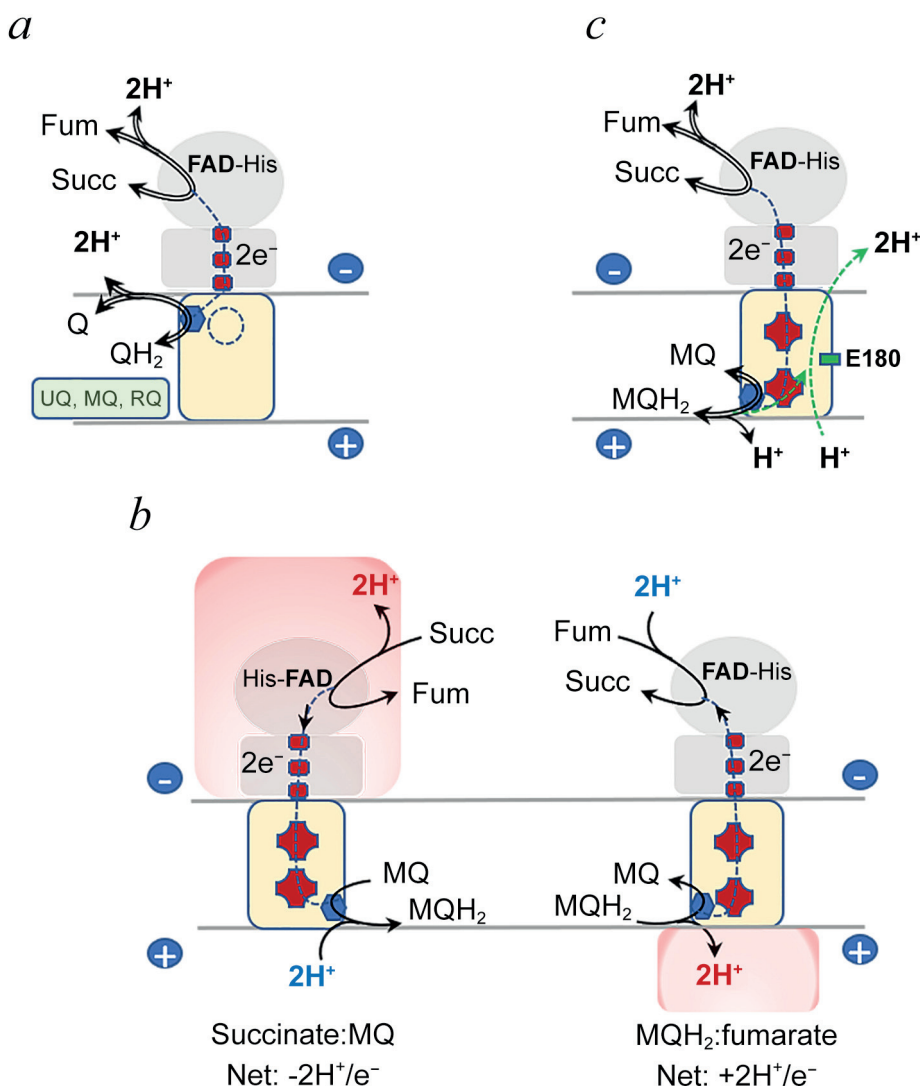


Рис. 2. Поток электронов и протонов в ферментах комплекса II. Перенос двух электронов между активными центрами в комплексе II связан с высвобождением или расходом $2H^+$ в процессе взаимопревращения сукцината/фумарата и восстановления или окисления хинона/хинола. *a* – В ферментах из группы I (рис. 1, *b*) перенос электронов не связан с электрохимическим мембранным потенциалом (Δp), поскольку все протоны реакции происходят из одного и того же клеточного компартмента. Пунктирный круг представляет редокс-кофактор, если он присутствует в этой группе комплекса II. В качестве субстрата выступают различные хиноны: убихинон (UQ), менахинон (MQ) и родохинон (RQ). *b* – В ферментах двугеомого комплекса II, таких как SQR *B. subtilis*, активные центры разделены мембраной. Реакции сукцинат:менахинонредуктаза способствует генерации Δp (слева). Обратная реакция окисления менахинола генерирует Δp , высвобождая $2H^+$ в периплазму и поглощая $2H^+$ в цитоплазме (справа). *c* – «Гипотеза E-пути», предложенная для двугеомого комплекса II с консервативным остатком глутамата в центре мембранного домена (показано зеленым квадратом), такого как Glu-C180 в QFR *W. succinogenes*. Такой механизм обеспечивает компенсаторный перенос двух протонов (зеленые стрелки) из периплазмы в цитоплазму и уравнивает дегидрогеназную реакцию в дикарбоксилатном сайте

В семействе существует еще один тип комплекса II, обозначаемый как тип E, который не обсуждается в настоящей статье. Этот довольно необычный тип (называемый неклассическим SQR) обнаружен в эпсилон-протеобактерии *W. succinogenes*. Этот белок с одиночным якорным белком SdhC выходит в периплазматическое пространство своим растворимым доменом, содержащим нековалентно связанный FAD. Структура этой однонаправленной фумаратредуктазы пока неизвестна [29].

СВЯЗЬ ПОТОКА ЭЛЕКТРОНОВ И ПРОТОНОВ В ФЕРМЕНТАХ КОМПЛЕКСА II

В ферментах комплекса II перенос электронов между каталитическими центрами осуществляется линейно по простетическим группам и сопряжен с переносом двух протонов в дикарбоксилатном и хинон-связывающем сайтах. Все члены семейства работают по одному и тому же каталитическому механизму в пределах

растворимого фрагмента АВ-дегидрогеназы. Два электрона переносятся в форме гидрида между дикарбоксилатным субстратом и FAD в субъединице А с последующим ступенчатым переносом электронов к [Fe-S] центрам в субъединице В с семихиноном FAD в качестве промежуточного компонента. В комплексах II из группы I восстановление/окисление хинона происходит в Q_P-сайте, следовательно, потребление/высвобождение протонов в каталитических центрах происходит в пределах одного и того же компартмента, и результат реакции оказывается нейтральным (рис. 2, а). Внутри этой группы QFR *E. coli* (фермент с мембранным якорем, свободным от кофакторов) связанный хинон непосредственно обменивается электронами с соседним центром [3Fe-4S]. Присутствие дополнительных редокс-групп в мембранном якоре, одиночного гема *b* (тип С) или центра Риске (тип F) не нарушает баланс протонов. По-видимому, роль этих дополнительных кофакторов в основном структурная. Например, каталитически активный SQR *E. coli* может быть собран без гема *b*, когда связанные с цитохромом гистидины (His) заменяются на тирозины (Tyr) [30]. Та же структурная роль центра Риске [2Fe-2S], вероятно, также наблюдается у Sdh1 *M. smegmatis*, однако замены аминокислотных остатков, дестабилизирующих [2Fe-2S] центр, негативно влияют на сборку мембраносвязанного комплекса. Это оставляет открытым вопрос о том, является ли этот кластер необходимым для восстановления/окисления хинона в этом типе комплекса II. Ферменты комплекса II с Q_P-сайтом характерны для широкого круга организмов, которые зависят от активности комплекса II в аэробных и анаэробных условиях. Поэтому было высказано предположение, а затем экспериментально подтверждено, что один и тот же сайт может содержать и работать с различными типами хинонов (UQ, MQ или RQ) [23, 31].

В ферментах комплекса II с двумя гемами оба гема *b* включены в цепь переноса электронов к Q_D-сайту, работающему с менахинонами с низким потенциалом (рис. 2, б). В этом случае высвобожденные или потребленные протоны в местах окисления или восстановления субстратов разделяются сопрягающей мембраной, и поэтому реакция менахинол:фумаратредуктаза генерирует электрохимический градиент протонов (Δp) с накоплением $2\text{H}^+/\text{e}^-$ в периплазматическом пространстве. Во время обратной реакции сукцинат:менахинонредуктаза перенос электронов от [3Fe-4S] центра через мембрану к MQ в Q_D-сайте обусловлен образовавшимся электрохимическим мембранным

потенциалом. Более того, $2\text{H}^+/\text{e}^-$ будут накапливаться с отрицательно заряженной стороны цитоплазмы, дополнительно уменьшая Δp . Этот механизм был экспериментально подтвержден исследованиями с использованием грамположительных бактерий *B. subtilis* [32] и *B. licheniformis* [33]. К неожиданности исследователей, реакция менахинол:фумаратредуктаза, катализируемая другим представителем QFR типа В *W. succinogenes*, оказалась электронейтральной [34]. Рентгеновская структура этого белка выявила остаток Glu-C180, погруженный в центр мембраны и ориентированный на пропионат С-кольца гема *b_D* в гидрофобной субъединице. Исследования по мутагенезу, подтверждающие важность этого остатка для механизма, привели к появлению так называемой «гипотезы E-пути». Согласно ей, Glu-C180 как часть менахинол:фумаратредуктазного механизма облегчает компенсаторный параллельный обмен протона на электрон из периплазмы в цитоплазму (рис. 2, в). Этот остаток сохраняется в некоторых ферментах комплекса II, действующих как менахинол:фумаратредуктазы, включая недавно полученную рентгеноструктуру другого QFR типа В из анаэробных восстанавливающих сульфат бактерий *D. gigas* [27].

ЭВОЛЮЦИЯ КОМПЛЕКСА II

Эволюция комплекса II ставит вопрос, как сохранение растворимого домена в семействе комплекса II соответствует разнообразию трансмембранных якорей? Предшествующий филогенетический анализ предполагал коэволюцию А и В субъединиц дегидрогеназного модуля [35]. Эволюционная модель, предложенная Хагерхалл и Хедерстедтом, предполагает, что мембраносвязанные ферменты комплекса II, возможно, произошли от первичного предка с двумя трансмембранными субъединицами и двумя цитохромами [2, 17]. Такая архитектура позволила бы исходному ферменту функционировать в качестве переносчика протонов, позволяя сайту передачи энергии работать в направлении фумаратредуктазы, а также поддерживать окисление сукцината хинонами с низким потенциалом. Действительно, сходство в общей топологии гидрофобного якоря в типах А, В и С членов семейства комплекса II предполагает, что они, возможно, эволюционировали путем утраты различных функционально важных элементов (рис. 3, а). Например, слияние двух небольших гидрофобных субъединиц с более крупным белком, содержащим два гема *b*, привело бы к образованию комплекса II типа В.

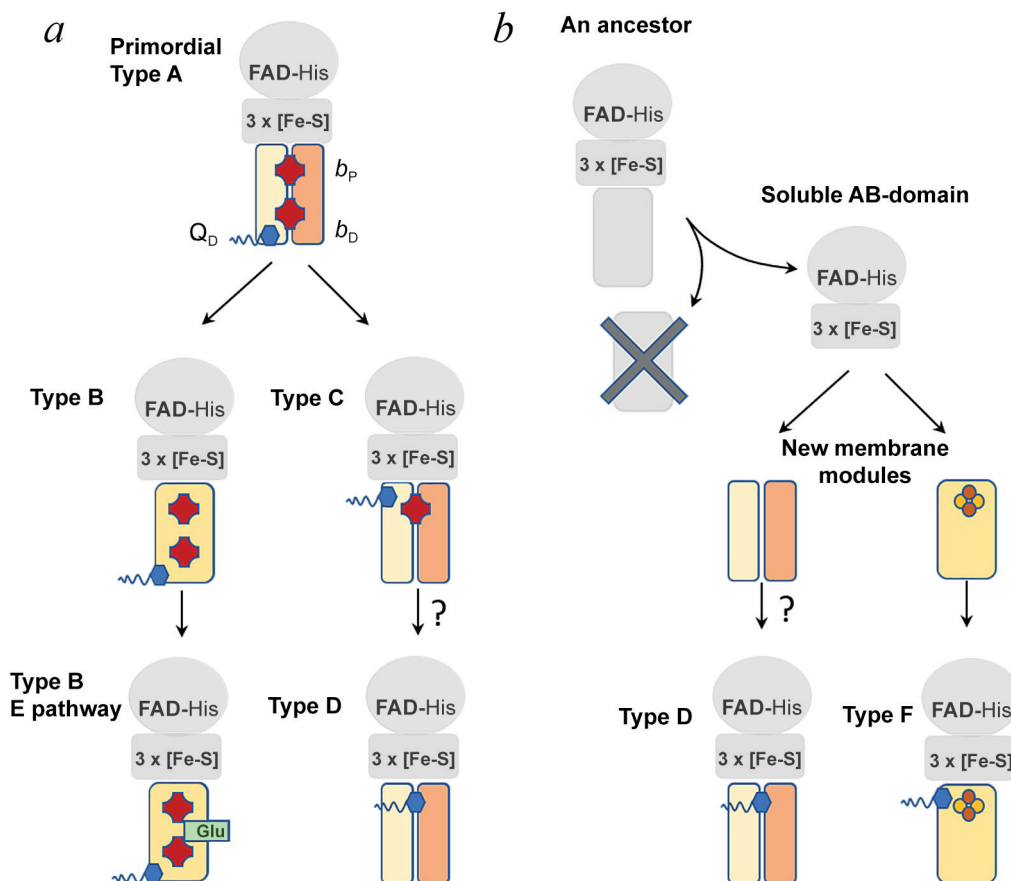


Рис. 3. Схема эволюции ферментов комплекса II. *a* – Эволюционная модель для цитохром-содержащих ферментов комплекса II. Гипотетическим предком был комплекс из четырех субъединиц с двумя гемами *b* и дистальным сайтом связывания хинона для менахинонов с низким потенциалом, напоминающий современный комплекс II типа А. Тип В сформировался в результате слияния генов двух гидрофобных субъединиц. Предковый тип В, возможно, эволюционировал дальше и утратил свои способности к связыванию энергии, разлив компенсаторный механизм переноса протонов (Е-путь). Тип С отделился от изначального типа А путем образования участка Q_P и потери дистального гема *b* и участка Q_D . Этот переход, возможно, был вызван увеличением содержания кислорода в атмосфере и наличием хинонов с высоким потенциалом. Дальнейшая эволюция фермента типа D произошла, вполне возможно, из-за потери проксимального гема *b*. *b* – Ферменты комплекса II без гема *b*, возможно, возникли в результате сборки *de novo*. Из-за потери связи с мембранным якорем стабильный растворимый АВ-домен мог взаимодействовать с другим мембранным модулем и образовывать комплексы типа F и, возможно, типа D

Подгруппа типа В с особым «Е-путём», вероятно, ответвилась от QFR типа В, участвующего в энергосопряжении. Структурное различие между ферментами типов D и F и членами типов А, В и С в мембранном домене комплекса II делает стратегию эволюции комплекса II как единого целого более сложной. Возможно, тип D произошел от исконного фермента типа С в результате потери гема *b*. Эта возможность была проверена экспериментально. В SQR *E. coli* замена цитохром лигирующих гистидинов в любой из гидрофобных субъединиц на тирозин предотвращала включение гема *b* в мембранный домен каталитически активного SQR [30]. Более того, такие гомологи типа С без гема, вероятно, существуют, как обнаружено для комплекса II из *Saccharomyces cerevisiae* [36], однако отсутствие структурного сходства между сайтами Q_P в ферментах типа С и D может

опровергнуть вышеупомянутое предположение. Якорь в одиночной субъединице типа F с [2Fe-2S] центром является еще одной уникальной конфигурацией в семействе комплекса II. Растворимые домены SdhAB или FrdAB *E. coli* стабильны и могут накапливаться в цитоплазме клеток, где соответствующие им якоря были удалены или нарушены при мутагенезе. Это создало бы гипотетическую возможность ассоциации фрагмента дегидрогеназы с другим гидрофобным участком. Разумно предположить, что образование комплекса II с гидрофобными доменами типов D и F может быть результатом таких *de novo* эволюционных событий (рис. 3, *b*).

Недавно полученная структура Sdh2 *M. smegmatis* является первой структурой комплекса II типа А, которая напоминает ранние формы фермента и может дать представление об эволюции линий типов В и С.

КРАТКИЙ ОБЗОР СТРУКТУРЫ Sdh2 *M. smegmatis*

Структура Sdh2 *M. smegmatis* является первой среди семейства комплекса II, которая была определена методом крио-ЭМ с общим разрешением 2,8 Å [28]. Структура аналогична SQR *E. coli* [20], образует тример и демонстрирует отчетливые взаимодействия между протомерами тримера. Каждая мономерная единица в ансамбле состоит из четырех известных субъединиц комплекса II SdhABCD. Два гема *b* расположены внутри гидрофобного трансмембранного якоря. Внутри каждой мономерной единицы была также идентифицирована дополнительная плотность, соответствующая одной трансмембранной спирали. Ее наличие было обусловлено присутствием ранее не описанной субъединицы Sdh2, получившей название SdhF. Эта новая субъединица представляет собой небольшой белок из 32 а.о., присутствие которого в выделенном белке не может быть выявлено с помощью SDS-PAGE, хотя было подтверждено при помощи масс-спектрометрии [28]. Геномный анализ показал, что гомологи последовательностей SdhF обнаружены в основном у микобактерий.

Sdh2 *M. smegmatis* и дигемовые QFRs. В настоящее время получены две рентгеновские структуры, демонстрирующие комплекс типа с так называемым «механизмом E-пути». Пять из шести трансмембранных спиралей, обнаруженных в гидрофобных субъединицах Sdh2 *M. smegmatis*, наложены на пять спиралей QFR *W. succinogenes* [37] с некоторой разницей в углах спиралей в положительно заряженном участке мембраны. Плоскости двух молекул гема *b* в структуре Sdh2 почти перпендикулярны и аналогичны положениям гема *b* в QFR *W. succinogenes*. Аксиальное связывание бис-гистидина и ориентация пропионатных групп гема *b_p* вблизи цитоплазматической поверхности сохраняются во всех цитохром-содержащих комплексах II. Положение гема *b_D* в Sdh2, однако, отличается от структуры *W. succinogenes*. Различия в расположении спиралей, вероятно, способствовали наклону плоскости гема. Гем *b_D* в Sdh2 также имеет заметно отличающуюся ориентацию пропионатных групп гема, таким образом, что пропионаты C-кольца ориентированы в направлении, противоположном направлению, описанному в QFR *W. succinogenes* (рис. 4, *a*). В QFR ориентация пропионатов

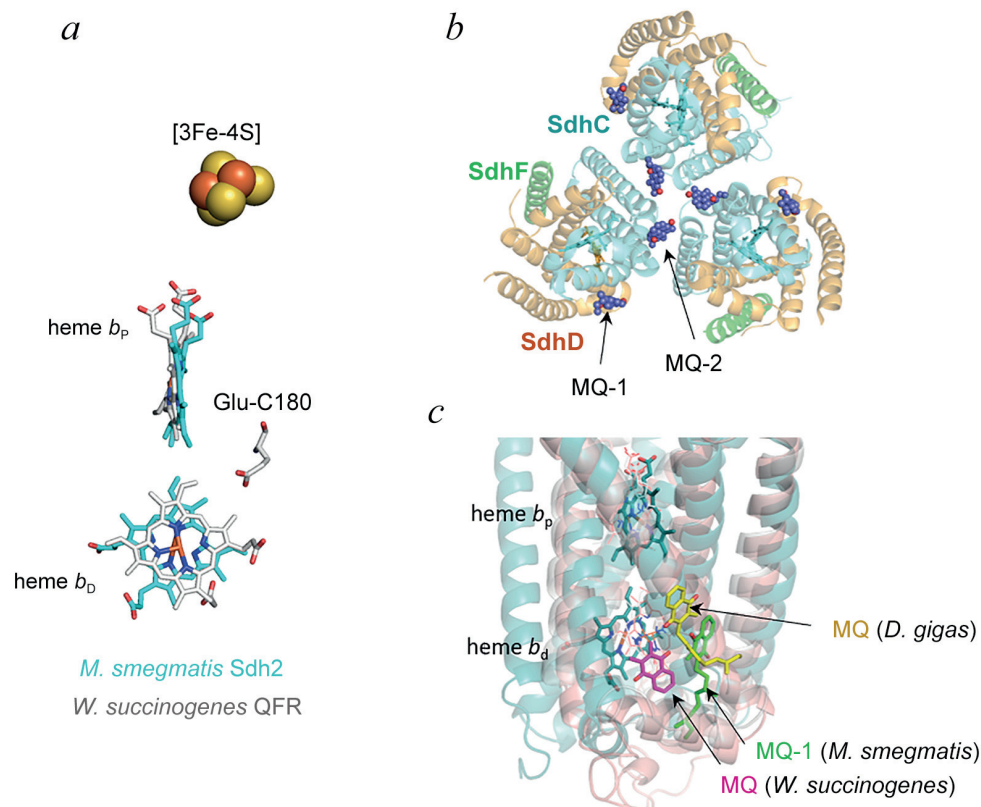


Рис. 4. Сравнение структуры Sdh2 *M. smegmatis* со структурами дигемовых QFRs из *W. succinogenes* и *D. gigas*. *a* – Наложенные структуры Sdh2 *M. smegmatis* (PDB: 6LUM, в бирюзовом цвете) и QFR *W. succinogenes* (PDB: 1E7P, в сером цвете) демонстрируют в QFR гемы *b*, [3Fe-4S] кластер и Glu-C180. *b* – В трёхмерной структуре Sdh2 *M. smegmatis* связаны две молекулы менахинона с одним мономером. *c* – Выравнивание структур Sdh2 *M. smegmatis* (в бирюзовом цвете), QFR *W. succinogenes* (в розовом цвете) и QFR *D. gigas* (PDB: 5XMJ, в жёлтом цвете). Показаны молекулы менахинона в каждой структуре

гема в сторону консервативного Glu-C180 в середине мембраны подчеркивает существование механизма протонного сопряжения в «Е-пути». Отсутствие зарядов в мембранной части гидрофобных остатков в Sdh2 предполагает наличие механизма генерации Δp в реакции менахинол: фумарат в этом ферменте (рис. 2, *b*). Было бы интересно выяснить, согласуется ли ориентация пропионатов гема b_D с механизмом сопряжения и коррелирует ли она в двух подгруппах ферментов комплекса II В-типа (рис. 3, *a*).

Структура Sdh2 *M. smegmatis* содержит две эндогенные молекулы MQ на каждую мономерную единицу (рис. 4, *b*). Эти молекулы MQ пространственно разделены и расположены почти напротив друг друга внутри мономера в дистальной части гидрофобного домена. Внутри тримера одна молекула MQ (именуемая MQ-1) обращена за пределы тримера. Вторая молекула MQ (называемая MQ-2) также связана с поверхностью гидрофобного домена, но является встроенной в тример между соседними мономерами. Способы связывания этих двух молекул MQ, однако, не удовлетворяют основным требованиям к каталитическим сайтам связывания хинонов; менахиноны, по-видимому, расположены на поверхности в отсутствие полярных аминокислот, необходимых для катализа. Наиболее явно сайт связывания MQ с ферментами дигемового комплекса II продемонстрирован в структуре QFR *W. succinogenes*, где MQ погружён в белок и расположен близко к гему b_D (4,5 Å) и каталитически важному Glu-C66 (6,6 Å) [37]. В структуре QFR *D. gigas* место прикрепления к поверхности молекулы менахинона довольно схоже с расположением Sdh2 MQ-1 (рис. 4, *c*). Для проверки функциональности этих первичных сайтов связывания в Sdh2 *M. smegmatis* были получены две подгруппы мутаций. В каждой подгруппе было пять остатков, которые были замещены аланином, однако кинетический анализ этих мутантов был проведен с помощью неадекватного метода, который определял K_m сукцината, а не хинона. Таким образом, проблема идентификации функционального сайта Q_p в Sdh2 *M. smegmatis* остается открытой.

Сайт связывания хинона в Sdh2 *M. smegmatis* и SQR *E. coli*. SQR *E. coli* сыграл важную роль в понимании механизма катализа в единственном сайте связывания хинона и роли гема *b* в комплексе II типа С [38]. В Sdh2 *M. smegmatis* общая структура четырех установленных субъединиц комплекса II очень похожа на таковую в SQR *E. coli*, включая топологию домена SdhCD (рис. 5, *a*). Единственный функциональный сайт Q_p в SQR *E. coli* описывается как углубле-

ние, в котором связывается хинон со структурно консервативными остатками в комплексе II типа С, который действует как SQR (у *E. coli*, свиньи, птиц) и QFR (*A. suum*). Сравнение структур Sdh2 *M. smegmatis* и SQR *E. coli* показывает, что три консервативных остатка Asp-D118, Tyr-D119 и Arg-C34 обнаружены в Sdh2 в тех же положениях, что и в SQR *E. coli* (рис. 5, *b*), что является весьма примечательным сходством. Путём мутирования четырех ключевых остатков в SQR *E. coli*, Ser-C27, Arg-C31, Asp-D82 и Tyr-D83, было показано, что они играют важную роль в функционировании фермента [38–40]. Эти остатки обеспечивают многочисленные полярные контакты с молекулой убихинона, в частности, Tyr-D83 и Ser-C27 с наибольшей вероятностью либо непосредственно, либо опосредованно через молекулы воды работают как сайты для протонирования/депротонирования хинона [38]. Arg-C31 связан с пропионатной группой гема и образует солевой мостик с консервативным Asp-D82, обеспечивая, таким образом, прочную связь между спиралью I SdhC и спиралью II SdhD; эти спирали содержат гистидины, связывающиеся с гемом b_p , и каталитические остатки Tyr-D83 и Ser-C27 (рис. 5, *b*). При помощи мутагенеза было показано, что замена Arg-C31 или Asp-D82 на лейцин (Leu) не влияет на стабильность мутантных ферментов или на средний потенциал гема *b*, но серьезно нарушает катализ с уби- и менахинонами [40]. Таким образом, это указывает на их роль в сложной сети водородных связей, необходимых для протонирования хинона.

В SQR *E. coli* замена Ser-C27 на аланин вызывала 25-кратное снижение активности UQ-редуктазы, подчёркивая её роль в протонировании убихинона [40]. В Sdh2 *M. smegmatis* объёмный Trp-C30 находится в том же положении, что и остаток Ser-C27 в SQR *E. coli*, и он не только влияет на способность протонирования Q_p -сайта, но также ограничивает доступ UQ или MQ к месту связывания хинона (рис. 5, *b*). Сравнение последовательностей субъединиц SdhC и SdhD *E. coli* с ферментами комплекса II типа А показывает, что остатки, образующие солевой мостик (гомологичные Arg-C31 или Asp-D82), сохраняются, в то время как остатки, участвующие в протонном обмене с хинонами, не сохраняются (рис. 5, *c*). Сравнение последовательностей выделяет другой консервативный остаток внутри этих спиралей: His-C33 в Sdh2 *M. smegmatis* и эквивалентный His-C30 в SQR *E. coli*. Было обнаружено, что этот остаток гистидина не является критичным для стабильности или активности SQR *E. coli* [41], однако положение и ориентация боковой цепи гистидина

Благодарности. Я посвящаю этот обзор моему учителю Андрею Дмитриевичу Виноградову. Он посвятил большую часть своей научной жизни изучению митохондриального комплекса II, который он часто называл «моей первой любовью в науке». Я также хотела бы поблагодарить Gary Cecchini за прочтение рукописи.

Конфликт интересов. Автор заявляет об отсутствии конфликта интересов в финансовой или иной сфере.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cecchini, G. (2003) Function and structure of complex II of the respiratory chain, *Annu. Rev. Biochem.*, **72**, 77-109, doi: 10.1146/annurev.biochem.72.121801.161700.
- Hagerhall, C. (1997) Succinate: quinone oxidoreductases. Variations on a conserved theme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1320**, 107-141, doi: 10.1016/s0005-2728(97)00019-4.
- Sharma, P., Maklashina, E., Cecchini, G., and Iverson, T. M. (2019) Maturation of the respiratory complex II flavoprotein, *Curr. Opin. Struct. Biol.*, **59**, 38-46, doi: 10.1016/j.sbi.2019.01.027.
- Sharma, P., Maklashina, E., Cecchini, G., and Iverson, T. M. (2018) Crystal structure of an assembly intermediate of respiratory Complex II, *Nat. Commun.*, **9**, 274, doi: 10.1038/s41467-017-02713-8.
- Kounosu, A. (2014) Analysis of covalent flavinylation using thermostable succinate dehydrogenase from *Thermus thermophilus* and *Sulfolobus tokodaii* lacking SdhE homologs, *FEBS Lett.*, **588**, 1058-1063, doi: 10.1016/j.febslet.2014.02.022.
- Lill, R., and Freibert, S. A. (2020) Mechanisms of Mitochondrial Iron-Sulfur Protein Biogenesis, *Annu. Rev. Biochem.*, **89**, 471-499, doi: 10.1146/annurev-biochem-013118-111540.
- Bai, Y., Chen, T., Happe, T., Lu, Y., and Sawyer, A. (2018) Iron-sulphur cluster biogenesis via the SUF pathway, *Metalomics*, **10**, 1038-1052, doi: 10.1039/c8mt00150b.
- Heuts, D. P., Scrutton, N. S., McIntire, W. S., and Fraaije, M. W. (2009) What's in a covalent bond? On the role and formation of covalently bound flavin cofactors, *FEBS J.*, **276**, 3405-3427, doi: 10.1111/j.1742-4658.2009.07053.x.
- Hao, H. X., Khalimonchuk, O., Schraders, M., Dephore, N., Bayley, J. P., et al. (2009) SDH5, a gene required for flavination of succinate dehydrogenase, is mutated in paraganglioma, *Science*, **325**, 1139-1142, doi: 10.1126/science.1175689.
- McNeil, M. B., Clulow, J. S., Wilf, N. M., Salmond, G. P., and Fineran, P. C. (2012) SdhE is a conserved protein required for flavinylation of succinate dehydrogenase in bacteria, *J. Biol. Chem.*, **287**, 18418-18428, doi: 10.1074/jbc.M111.293803.
- Van Vranken, J. G., Na, U., Winge, D. R., and Rutter, J. (2015) Protein-mediated assembly of succinate dehydrogenase and its cofactors, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **50**, 168-180, doi: 10.3109/10409238.2014.990556.
- Moosavi, B., Berry, E. A., Zhu, X. L., Yang, W. C., and Yang, G. F. (2019) The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics, *Cell. Mol. Life Sci.*, **76**, 4023-4042, doi: 10.1007/s00018-019-03200-7.
- Tedeschi, G., Negri, A., Mortarino, M., Ceciliani, F., Simonic, T., et al. (1996) L-aspartate oxidase from *Escherichia coli*. II. Interaction with C4 dicarboxylic acids and identification of a novel L-aspartate: fumarate oxidoreductase activity, *Eur. J. Biochem.*, **239**, 427-433, doi: 10.1111/j.1432-1033.1996.0427u.x.
- Taylor, P., Pealing, S. L., Reid, G. A., Chapman, S. K., and Walkinshaw, M. D. (1999) Structural and mechanistic mapping of a unique fumarate reductase, *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 1108-1112, doi: 10.1038/70045.
- Maklashina, E., Rajagukguk, S., Iverson, T. M., and Cecchini, G. (2018) The unassembled flavoprotein subunits of human and bacterial complex II have impaired catalytic activity and generate only minor amounts of ROS, *J. Biol. Chem.*, **293**, 7754-7765, doi: 10.1074/jbc.RA118.001977.
- Maklashina, E., Iverson, T. M., Sher, Y., Kotlyar, V., Andrell, J., et al. (2006) Fumarate reductase and succinate oxidase activity of *Escherichia coli* complex II homologs are perturbed differently by mutation of the flavin binding domain, *J. Biol. Chem.*, **281**, 11357-11365, doi: 10.1074/jbc.M512544200.
- Hägerhäll, C., and Hederstedt, L. (1996) A structural model for the membrane-integral domain of succinate: quinone oxidoreductases, *FEBS Lett.*, **389**, 25-31, doi: 10.1016/0014-5793(96)00529-7.
- Lancaster, C. R. (2013) The di-heme family of respiratory complex II enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 679-687, doi: 10.1016/j.bbabi.2013.02.012.
- Iverson, T. M., Luna-Chavez, C., Cecchini, G., and Rees, D. C. (1999) Structure of the *Escherichia coli* fumarate reductase respiratory complex, *Science*, **284**, 1961-1966, doi: 10.1126/science.284.5422.1961.
- Yankovskaya, V., Horsefield, R., Tornroth, S., Luna-Chavez, C., Miyoshi, H., et al. (2003) Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation, *Science*, **299**, 700-704, doi: 10.1126/science.1079605.
- Huang, L. S., Shen, J. T., Wang, A. C., and Berry, E. A. (2006) Crystallographic studies of the binding of ligands to the dicarboxylate site of Complex II, and the identity of the ligand in the "oxaloacetate-inhibited" state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1073-1083, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.06.015.

22. Sun, F., Huo, X., Zhai, Y., Wang, A., Xu, J., et al. (2005) Crystal structure of mitochondrial respiratory membrane protein complex II, *Cell*, **121**, 1043-1057, doi: 10.1016/j.cell.2005.05.025.
23. Inaoka, D. K., Shiba, T., Sato, D., Balogun, E. O., Sasaki, T., et al. (2015) Structural insights into the molecular design of flutolanil derivatives targeted for fumarate respiration of parasite mitochondria, *Int. J. Mol. Sci.*, **16**, 15287-15308, doi: 10.3390/ijms160715287.
24. Hards, K., Rodriguez, S. M., Cairns, C., and Cook, G. M. (2019) Alternate quinone coupling in a new class of succinate dehydrogenase may potentiate mycobacterial respiratory control, *FEBS Lett.*, **593**, 475-486, doi: 10.1002/1873-3468.13330.
25. Zhou, X., Gao, Y., Wang, W., Yang, X., Yang, X., et al. (2021) Architecture of the mycobacterial succinate dehydrogenase with a membrane-embedded Rieske FeS cluster, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2022308118, doi: 10.1073/pnas.2022308118.
26. Lancaster, C. R., Kroger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution, *Nature*, **402**, 377-385, doi: 10.1038/46483.
27. Guan, H. H., Hsieh, Y. C., Lin, P. J., Huang, Y. C., Yoshimura, M., et al. (2018) Structural insights into the electron/proton transfer pathways in the quinol:fumarate reductase from *Desulfovibrio gigas*, *Sci. Rep.*, **8**, 14935, doi: 10.1038/s41598-018-33193-5.
28. Gong, H., Gao, Y., Zhou, X., Xiao, Y., Wang, W., et al. (2020) Cryo-EM structure of trimeric *Mycobacterium smegmatis* succinate dehydrogenase with a membrane-anchor SdhF, *Nat. Commun.*, **11**, 4245, doi: 10.1038/s41467-020-18011-9.
29. Juhnke, H. D., Hiltcher, H., Nasiri, H. R., Schwalbe, H., and Lancaster, C. R. (2009) Production, characterization and determination of the real catalytic properties of the putative "succinate dehydrogenase" from *Wolinella succinogenes*, *Mol. Microbiol.*, **71**, 1088-1101, doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06581.x.
30. Tran, Q. M., Rothery, R. A., Maklashina, E., Cecchini, G., and Weiner, J. H. (2007) *Escherichia coli* succinate dehydrogenase variant lacking the heme b, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 18007-18012, doi: 10.1073/pnas.0707732104.
31. Maklashina, E., Hellwig, P., Rothery, R. A., Kotlyar, V., Sher, Y., et al. (2006) Differences in protonation of ubiquinone and menaquinone in fumarate reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **281**, 26655-26664, doi: 10.1074/jbc.M602938200.
32. Schirawski, J., and Unden, G. (1998) Menaquinone-dependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential, *Eur. J. Biochem.*, **257**, 210-215, doi: 10.1046/j.1432-1327.1998.2570210.x.
33. Madej, M. G., Nasiri, H. R., Hilgendorff, N. S., Schwalbe, H., Unden, G., et al. (2006) Experimental evidence for proton motive force-dependent catalysis by the diheme-containing succinate:menaquinone oxidoreductase from the Gram-positive bacterium *Bacillus licheniformis*, *Biochemistry*, **45**, 15049-15055, doi: 10.1021/bi0618161.
34. Madej, M. G., Nasiri, H. R., Hilgendorff, N. S., Schwalbe, H., and Lancaster, C. R. (2006) Evidence for transmembrane proton transfer in a dihaem-containing membrane protein complex, *EMBO J.*, **25**, 4963-4970, doi: 10.1038/sj.emboj.7601361.
35. Schafer, G., Anemuller, S., and Moll, R. (2002) Archaeal complex II: "classical" and "non-classical" succinate:quinone reductases with unusual features, *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 57-73, doi: 10.1016/s0005-2728(01)00232-8.
36. Maklashina, E., Rajagukguk, S., McIntire, W. S., and Cecchini, G. (2010) Mutation of the heme axial ligand of *Escherichia coli* succinate-quinone reductase: implications for heme ligation in mitochondrial complex II from yeast, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 747-754, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.01.019.
37. Lancaster, C. R., Gorss, R., Haas, A., Ritter, M., Mantele, W., et al. (2000) Essential role of Glu-C66 for menaquinol oxidation indicates transmembrane electrochemical potential generation by *Wolinella succinogenes* fumarate reductase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 13051-13056, doi: 10.1073/pnas.220425797.
38. Maklashina, E., and Cecchini, G. (2010) The quinone-binding and catalytic site of complex II, *Biochim. Biophys. Acta*, **1797**, 1877-1882, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.02.015.
39. Silkin, Y., Oyedotun, K. S., and Lemire, B. D. (2007) The role of Sdh4p Tyr-89 in ubiquinone reduction by the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 143-150, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.11.017.
40. Tran, Q. M., Rothery, R. A., Maklashina, E., Cecchini, G., and Weiner, J. H. (2006) The quinone binding site in *Escherichia coli* succinate dehydrogenase is required for electron transfer to the heme b, *J. Biol. Chem.*, **281**, 32310-32317, doi: 10.1074/jbc.M607476200.
41. Tran, Q. M., Fong, C., Rothery, R. A., Maklashina, E., Cecchini, G., and Weiner, J. H. (2012) Out of plane distortions of the heme b of *Escherichia coli* succinate dehydrogenase, *PLoS One*, **7**, e32641, doi: 10.1371/journal.pone.0032641.
42. Maklashina, E., Rothery, R. A., Weiner, J. H., and Cecchini, G. (2001) Retention of heme in axial ligand mutants of succinate-ubiquinone oxidoreductase (complex II) from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 18968-18976, doi: 10.1074/jbc.M011270200.
43. Gu, L. Q., Yu, L., and Yu, C. A. (1990) Effect of substituents of the benzoquinone ring on electron-transfer activities of ubiquinone derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **1015**, 482-492, doi: 10.1016/0005-2728(90)90082-f.

STRUCTURAL INSIGHT INTO EVOLUTION OF THE QUINONE BINDING SITE IN COMPLEX II

Review

Elena Maklashina

*Department of Biochemistry and Biophysics, University of California,
San Francisco, CA 94143, USA; e-mail: elena.maklashina@ucsf.edu*

The Complex II family encompasses membrane bound succinate:quinones reductases and quinol:fumarate reductases that catalyze interconversion of succinate and fumarate coupled with reduction and oxidation of quinone. These enzymes are found in all biological genres and share a modular structure where a highly conserved soluble domain is bound to a membrane-spanning domain that is represented by distinct variations. The current classification of the complex II family members is based on the number of subunits and co-factors in the membrane anchor (types A-F). This classification also provides insights into possible evolutionary paths and suggests that some of the complex II enzymes (types A-C) co-evolved as the whole assembly. Origin of complex II types D and F may have arisen from independent events of *de novo* association of the conserved soluble domain with a new anchor. Here we analyze a recent structure of *Mycobacterium smegmatis* Sdh2, a complex II enzyme with two transmembrane subunits and two heme *b* molecules. This analysis supports an earlier hypothesis suggesting that mitochondrial complex II (type C) with a single heme *b* may have evolved as an assembled unit from an ancestor similar to *M. smegmatis* Sdh2.

Keywords: succinate:ubiquinone reductase, quinol:fumarate reductase, complex II, quinone binding site, cytochrome *b*