УДК 577.151.63

ГЕНЕРАЦИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦИТОХРОМОМ bd

Обзор

© 2023 В.Б. Борисов

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

> Поступила в редакцию 10.06.2023 После доработки 08.07.2023 Принята к публикации 11.07.2023

В обзоре даны современные представления о механизме генерации трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) в ходе каталитического цикла трёхгемовой терминальной хинолоксидазы типа *bd*. Предполагается, что основной вклад в образование $\Delta\psi$ вносит перемещение H⁺ поперёк мембраны по внутрибелковому гидрофильному протон-проводящему пути из цитоплазмы к кислородоредуктазному активному центру этого бактериального фермента.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, цитохром *bd*, гем, протон-движущая сила, мембранный потенциал.

DOI: 10.31857/S032097252310007X, EDN: OTSSEC

введение

В 1974 г. в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ Л.А. Драчёв и соавторы разработали электрометрический метод прямого измерения электрической активности сопрягающих мембран, дающий уникальную возможность отслеживать внутрибелковое перемещение электрических зарядов в пределах одного молекулярного оборота фермента [1]. С помощью этого метода удалось наблюдать в реальном времени генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta \psi$) бактериородопсином [2], реакционными центрами [3] и цитохромом bc_1 [4] фотосинтезирующих бактерий, а также терминальной цитохром с-оксидазой [5-7] и неканоническими ретиналь-содержащими бактериальными белками [8, 9]. Для изучения электрогенного механизма цитохром с-оксидаз применяются два разных подхода. В первом подходе используется фотохимическая инъекция одного электрона во встроенный в липосому фермент. При этом в качестве непосредственного фотоактивируемого восстановителя выступает трис(2,2'-бипиридил)рутений(II) хлорид (RuBpy), образующий за счёт электростатических взаимодействий комплекс с сайтом связывания цитохрома с в оксидазе вблизи входного редокс-центра Cu_A [5, 6]. В результате фотовозбуждения RuBpy импульсным лазером электрон с RuBpy* переносится на Cu_A. Окисленный RuBpy ревосстанавливается анилином. Этот подход позволяет регистрировать с разрешением во времени электрогенный перенос зарядов в ходе отдельных одноэлектронных переходов в каталитическом цикле цитохром с-оксидазы [7]. Во втором подходе для инициирования ферментативной реакции в режиме одного оборота используется лазерный импульсный фотолиз комплекса монооксида углерода (СО) с кислородсвязывающим высокоспиновым гемом a_3 . Образование комплекса СО с частично или полностью восстановленным ферментом происходит в анаэробных условиях. Затем в анаэробную ячейку с оксидазой, связавшей СО, вносят при помощи техники быстрого смешивания растворён-

Принятые сокращения: H^+/e^- – стехиометрия протон/электрон, которая в случае дыхательной цепи *Escherichia coli* подразумевает количество высвобождаемых в периплазму протонов на один электрон, используемый для восстановления кислорода до воды; Δp – протон-движущая сила; $\Delta \psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов; τ – характеристическое время, обратное константе скорости ($t_{1/e}$).

ный в воде кислород (O₂). В ходе распада комплекса CO–оксидаза, запускаемого фотолизом, O₂ связывается с гемом a_3 и восстанавливается электронами, присутствующими в оксидазе, что сопровождается генерацией $\Delta \psi$ [10]. Таким образом, во втором подходе используется сочетание прямого электрометрического метода [1] и метода «флоу-флэш» [11]. У терминальных хинолоксидаз, в том числе цитохрома *bd*, которому и посвящён этот обзор, сайт связывания цитохрома *c* отсутствует. По этой причине для отслеживания перемещения электрических зарядов внутри их белковой молекулы первый подход неприменим.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА bd

Мембраносвязанные терминальные оксидазы аэробных дыхательных цепей организмов относят к транслоказам (класс 7 ферментов). Они катализируют реакцию четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода до воды ферроцитохромом с либо хинолом (убихинолом, менахинолом и, возможно, пластохинолом) [12, 13]. Катализируемая окислительно-восстановительная реакция сопряжена с генерацией Δp (протон-движущей силы). Δp представляет собой «энергетическую валюту» и используется клеткой для синтеза АТР с помощью механизма окислительного фосфорилирования [14]. Терминальные оксидазы делят на два эволюционно неродственных надсемейства: гем/Си-содержащих оксидаз и оксидаз типа bd, также называемых цитохромами bd [15-18]. В отличие от гем-медных оксидаз, все биохимически охарактеризованные цитохромы bd являются хинолоксидазами, не содержат Си и встречаются только у бактерий и архей, в том числе патогенных [19-21]. Последнее обстоятельство позволяет рассматривать *bd*-ферменты в качестве перспективных терапевтических мишеней [21, 22]. Поскольку генерация $\Delta \psi$ в режиме одного молекулярного оборота изучена пока только у терминальных bd-оксидаз Escherichia coli, следует остановиться на этих ферментах подробнее.

Подобно электрон-транспортным цепям многих бактерий, аэробная дыхательная цепь *E. coli* разветвлена. Её терминальный участок в общем случае представлен тремя хинолоксидазами: гем-медным цитохромом *bo*₃ и двумя цитохромами *bd* – *bd*-I и *bd*-II [23, 24]. В отличие от оксидаз типа *bd*, цитохром *bo*₃ образует Δp по механизму протонного насоса, что позволяет двукратно увеличить стехиометрию перекачки протон/электрон (H⁺/e⁻) [25, 26]. Цитохромы bo₃, bd-I и bd-II кодируются оперонами *cyoABCDE*, *cydABX* и *appCBX* соответственно. суоАВСDЕ экспрессируется преимущественно при высоком парциальном давлении О₂, тогда как *суdABX* – преимущественно в микроаэробных условиях. Экспрессия *аррСВХ* индуцируется при анаэробном росте E. coli, вступлении культуры в стационарную фазу роста и фосфатном голодании [24]. В последнее время появляется всё больше свидетельств того, что, помимо функционирования в качестве молекулярных преобразователей энергии, оксидазы типа bd принимают участие в других жизненно важных процессах в бактериальной клетке [27–30]. Цитохром bd-I вовлечён в образование дисульфидных связей при сворачивании белка [31], процесс биосинтеза гема [32], а также защиту бактерии от антибиотиков [33], пероксинитрита [34], монооксида азота [35-41] и аммиака [42]. Обе bd-оксидазы (bd-I и bd-II) также наделяют *E. coli* устойчивостью к цианиду [43], сульфиду [43-45] и перекиси водорода [46-54].

Недавно были опубликованы трёхмерные структуры обоих bd-ферментов E. coli (рис. 1, 2) [55–58]. Обнаружено, что цитохром *bd*-I содержит четыре субъединицы (CydA, CydB, CydX, CydY), тогда как цитохром bd-II – только три (АррС, АррВ, АррХ). При этом субъединицы CydA, CydB и CydX имеют гомологию с субъединицами АррС, АррВ и АррХ соответственно. Две большие субъединицы, CydA/AppC и СуdB/АррВ, образуют структурную сердцевину белка. Из других структурных отличий между двумя bd-оксидазами следует отметить, что белок bd-II, встроенный в амфиполы, в основном присутствует в виде димера (рис. 2), тогда как фермент bd-I существует только в виде мономера [57] (рис. 1). Кислородный канал в цитохроме bd-II имеет меньший диаметр по сравнению с таковым цитохрома bd-I [57]. Кроме того, предполагаемый протон-проводящий путь в ферменте bd-II короче, чем в оксидазе bd-I [57]. Субъединица СуdA/АррС содержит в своём составе три разных гема, выступающих в качестве редокс-кофакторов: один низкоспиновый гексакоординированный, b₅₅₈, и два высокоспиновых пентакоординированных, b₅₉₅ и d. Аксиальными лигандами гемов служат аминокислотные остатки субъединицы СуdA/АррС. Это His186 и Met393 для гема *b*₅₅₈ и Glu445 для гема *b*₅₉₅ [55–58]. В цитохроме *bd*-II аксиальным лигандом гема *d* является His19 [57-58]. В случае цитохрома bd-I данные о природе аксиального лиганда гема d противоречивы. Safarian et al. [56] утверждают, что это также His19, однако согласно модели



Рис. 1. Трёхмерная структура цитохрома *bd*-I *E. coli* с разрешением 3,3 Å (PDB ID 6RX4). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и *d*, связанных с субъединицей CydA, в структуре белка обнаруживаются убихинон-8 (Q8) и глицерофосфолипид (показан символами сферической формы), связанные с субъединицей CydB. Рисунок взят из работы Theßeling et al. [55] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

Theßeling et al. [55], таким лигандом служит Glu99. Гемы в белке расположены треугольником (рис. 3). Дополнительным структурным элементом в CydA/AppC является так называемая Q-петля. Она находится вблизи гема b₅₅₈ и непосредственно участвует в связывании хинола, липофильного донора электронов. Другая большая субъединица, CydB/ АррВ, не обнаруживает в своём составе какихлибо металл-содержащих кофакторов. Вместо этого она несёт на себе прочно связанный убихинон-8 или деметилменахинон-8. Этот хинон занимает положение, эквивалентное сайту связывания гема в СуdA/АррС, и, вероятно, играет роль в стабилизации структуры белка. Гем *b*₅₅₈ является первичным акцептором электронов при окислении хинола. Гем d служит сайтом связывания О2 и его последующего восстановления до 2H₂O [59, 60]. Гем *d* в цитохроме bd-I имеет необычайно высокое сродство к О2, при этом образующийся оксигенированный комплекс очень стабилен [61-64]. Функция гема b_{595} не вполне понятна. Слишком большое расстояние между центральными атомами Fe гемов b₅₉₅ и d (10,9–11,3 Å), скорее всего, не позволяет им сформировать структурный биядерный центр, подобный таково-



Рис. 2. Трёхмерная структура димера цитохрома *bd*-II *E. coli* с разрешением 3,0 Å (PDB ID 7OSE). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и *d*, связанных с субъединицей АррС, в структуре белка обнаруживается убихинон-8 (показан красным цветом), связанный с субъединицей АррВ. Рисунок взят из работы Grauel et al. [57] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License



Рис. 3. Треугольное расположение гемов *b*₅₅₈, *b*₅₉₅ и *d* в субъединице СуdA цитохрома *bd*-I *E. coli*. Периплазма – вверху рисунка, цитоплазма – внизу рисунка. Рисунок взят из работы Theßeling et al. [55] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

му у гем-медных оксидаз. Тем не менее вандер-ваальсовы контакты между этими гемами возможны, поскольку расстояние между их краями гораздо меньше (3,5-3,8 Å) [55–58]. Последнее обстоятельство предполагает возможность очень быстрого переноса электрона между гемами b_{595} и d, что получило экспериментальное подтверждение [65, 66]. Поэтому можно считать, что эти гемы образуют функциональный дигемовый центр. Такое предположение согласуется с данными ряда исследований [67–79]. Электрон, пришедший с хинола на гем b_{558} , по-видимому, переносится на гем b_{595} и затем на гем d.

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ И КАТАЛИТИЧЕСКИЙ ЦИКЛ ЦИТОХРОМА *bd-1 E. coli*

Использование оптического и электрометрического методов в сочетании с методом «флоу-флэш» позволило наблюдать в реальном времени промежуточное образование и распад отдельных интермедиатов каталитического цикла цитохрома bd-I E. coli при температуре 21 °C [26, 80-83]. Предполагаемая схема последнего показана на рис. 4. В спектроскопических исследованиях гемопротеин находился в мицеллах детергента, а в электрометрических был встроен в липосомы. Исходно в эксперименте фермент переводился в полностью восстановленное состояние, в котором гем d был связан с СО (\mathbf{R}^3 -СО, $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$ -СО). Фотолиз СО из этого состояния оксидазы приводит к промежуточному появлению формы цитохрома *bd*-I, не связанной с СО (\mathbf{R}^3 , $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$). Этот переход (\mathbf{R}^3 -CO \rightarrow \mathbf{R}^3) не разрешается во времени как в спектрофотометрических, так и в электрометрических измерениях. В присутствии О₂ происходит связывание молекулы этого двухатомного газа с гемом d. В результате образуется оксигенированный комплекс интермедиат \mathbf{A}^3 ($b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}-\mathbf{O}_2$). Скорость образования А³ прямо пропорциональна концентрации О₂, при этом константа скорости второго порядка составляет около $2 \times 10^9 \, M^{-1} \, c^{-1}$ [64, 82]. Переход $\mathbf{R}^3 \rightarrow \mathbf{A}^3$ не сопровождается генерацией $\Delta \psi$ [26, 82, 83]. А³ быстро ($\tau \sim 4,5$ мкс, т – характеристическое время, обратное константе скорости, $t_{1/e}$) превращается в интермедиат, который Belevich et al. впервые описали и назвали соединением Р [82]. Обнаружено, что переход $A^3 \rightarrow P$ также не сопряжён с генерацией $\Delta \psi$ [26, 82, 83]. В отличие от генерации A^3 из R^3 , скорость образования соединения P не зависит от концентрации О2. В ходе перехода $A^3 \rightarrow P$ гем b_{595} подвергается окислению, гем b₅₅₈ остаётся в восстановленном состоянии, а новая кислородная форма гема d демонстрирует необычный максимум поглощения при 635 нм [82]. Единого мнения о химической структуре соединения Р до сих пор нет. Belevich et al. в первоначальной работе [82] предположили, что Р – истинный перекисный комплекс либо феррильный интермедиат с аминокислотным радикалом или катионрадикалом порфиринового кольца. Согласно более поздним данным Paulus et al. [84], соединение Р представляет собой феррильную форму гема d с л-катион-радикалом на порфириновом кольце, которая находится в магнитном взаимодействии с гемом *b*₅₉₅. Важно подчеркнуть, что Paulus et al. [84] наблюдали образование соединения Р при температуре +1 °C, то есть в нефизиологических условиях. Возможно, что спектральный интермедиат Р, появление которого в реальном времени зарегистрировали Belevich et al. [82], является смесью истинного перекисного комплекса (*b*₅₅₈²⁺*b*₅₉₅³⁺*d*³⁺-О-О-(Н)) и феррил л-катионрадикала $(b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{*4+}=O^{2-})$ при условии того, что они имеют схожие спектры поглощения. На следующей стадии Р превращается (с т ~ 47 мкс) в нерадикальную форму феррильного комплекса гема d (соединение **F**), что сопровождается окислением гема b_{558} . Каталитический интермедиат F, скорее всего, имеет структуру $b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{4+}=O^{2-}$. Переход **Р** \rightarrow **F** сопряжён с генерацией $\Delta \psi$ [26, 82, 83].

bd-Оксидаза имеет в своём составе три гема. Поэтому если выделенный фермент не содержит связанного хинола, то можно ожидать, что в полностью восстановленном состоянии он несёт на себе три электрона (\mathbf{R}^3). В этом случае реакция \mathbf{R}^3 с O_2 останавливается на образовании соединения F [80]. Если же цитохром *bd*-I включает в себя молекулу связанного хинола, являющегося двухэлектронным донором, то его окисление в присутствии O_2 позволяет осуществить превращение F в интермедиат \mathbf{A}^1 с $\tau \sim 0.6-1.1$ мс [81, 82]. \mathbf{A}^1 , вероятно, представляет собой одноэлектронную форму оксидазы с оксикомплексом



единения A^3 , P, F, O^1 , A^1 – каталитические интермедиаты фермента. Соединения R^3 и R^3 –CO не являются частью каталитического цикла оксидазы, но могут быть получены искусственным путём. Красные «стрелки сопряжения» обозначают генерацию $\Delta \psi$ при переходах $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow A^1$. Структура соединений обсуждается в тексте обзора

гема d ($b_{558}{}^{3+}b_{595}{}^{3+}d^{2+}-O_2$). Переход $\mathbf{F} \rightarrow \mathbf{A}^1$, как и предыдущий, $\mathbf{P} \rightarrow \mathbf{F}$, сопровождается генерацией $\Delta \psi$ [81, 82]. Образуется ли $\Delta \psi$ ещё на одной частной стадии каталитического цикла – в переходе $\mathbf{A}^1 \rightarrow \mathbf{A}^3$ (рис. 4), пока неизвестно.

Обнаружено, что в стационарных условиях в присутствии О₂ и убихинола-1 основными каталитическими интермедиатами цитохрома bd-I являются F и A¹ (каждый составляет примерно по 40% от общего количества) [60]. При этом около 20% оксидазы, вероятно, находится в состоянии O^1 – одноэлектронной форме с окисленным гемом d ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}$ -OH). Состояние О¹ в экспериментах в режиме одного оборота с использованием метода «флоуфлэш» зарегистрировано не было [80, 82, 83]. Тем не менее в настоящее время принято думать, что O^1 , по-видимому, также является каталитическим интермедиатом цитохрома bd-I (рис. 4). Стоит также отметить, что форма \mathbf{R}^3 фермента, скорее всего, не входит в число его каталитических интермедиатов [59, 60], однако для нужд эксперимента может быть легко произведена искусственным путём.

В 2005 г. Belevich et al. [81] на основании полученных результатов постулировали существование внутрибелкового протон-проводящего пути для переноса Н⁺ из цитоплазмы в кислородоредуктазный центр цитохрома bd-I. Авторы предположили, что такое перемещение Н⁺ поперёк мембраны, сопряжённое с переносом электрона с гема b_{558} на гемы b_{595} и d, сопровождается генерацией $\Delta \psi$, наблюдаемой в экспериментах [26, 80-83]. Выброс H⁺ в периплазматическое пространство при окислении хинола ферментом также вносит вклад в создание Δ*p*. Опубликованные в 2019 г. трёхмерные структуры bd-I-оксидазы с разрешением 2,68 Å (PDB ID 6RKO) [56] и 3,3 Å (PDB ID 6RX4) [55] подтвердили гипотезу, выдвинутую Belevich et al. [81]. В структурах видна цепочка молекул воды, тянущаяся вдоль гидрофильного протон-проводящего пути, который начинается в цитоплазматическом интерфейсе между субъединицами CydA и CydB и проходит перпендикулярно плоскости мембраны к гему *d*. Этот протон-проводящий путь составляют несколько гидрофильных аминокислотных остатков (рис. 5). С цитоплазматической стороны путь начинается с Asp119^{CydA}, затем, по-видимому, в его состав входят Lys 57^{CydA} , Lys 109^{CydA} , Asp 105^{CydA} , Tyr 379^{CydB} и, наконец, Аsp58^{СуdB}, с которого протоны, вероятно, поступают на пропионатную группу гема d [55]. Высказано предположение, что консервативные гидрофильные остатки Ser108^{СудА}, Glu107^{СудА} и Ser140^{СудА} также относятся к этому пути,



Рис. 5. Предполагаемый протон-проводящий путь в цитохроме *bd-1 E. coli*. Путь выстлан боковыми цепями нескольких гидрофильных аминокислот и позволяет переносить протоны с цитоплазматической стороны мембраны к пропионату гема *d*. В нём также обнаруживаются многочисленные молекулы воды (обозначены символами сферической формы синего цвета). Рисунок взят из работы Friedrich et al. [22] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

облегчая перенос H^+ с Asp58^{CydB} на пропионат гема *d* [56].

Веlevich et al. [81] также выдвинули гипотезу, согласно которой в молекуле bd-I два аминокислотных остатка с протонируемыми группами чувствительны к редокс-состоянию высокоспиновых пентакоординированных гемов b_{595} и d. Исследования мутантных форм Glu445Ala и Glu107Leu цитохрома bd-I E. coli методами электрометрии и абсорбционной спектроскопии с микросекундным разрешением указывают на то, что такими функционально важными остатками служат высококонсервативные Glu445^{CydA} и Glu107^{CydA} соответственно [81, 83].

Как указано выше, Glu445^{СуdA} — аксиальный лиганд железа гема b_{595} [55, 56]. Его замена на Ala в субъединице СуdA приводит к инактивации фермента. При этом гем b_{595} удерживается в белке, но теряет способность к восстановлению даже в присутствии сильного донора электронов — дитионита, добавленного в избытке [81]. Как и в случае цитохрома *bd*-I дикого типа, в реакции восстановленного мутантного фермента Glu445Ala с кислородом наблюдается начальная неэлектрогенная стадия, состоящая из переходов $\mathbf{R}^3 \rightarrow \mathbf{A}^3$ и $\mathbf{A}^3 \rightarrow \mathbf{P}$. Однако у мутанта, в отличие от дикого типа, при генерации $\Delta \psi$ не выявляется микросекундная фаза. Вместо этого у мутантной формы наблюдается более медленная, небольшая электрогенная фаза ($\tau \sim 1,3$ мс; амплитуда – 0,36 мВ), за которой следует электрогенный переход гораздо большей амплитуды ($\tau \sim 12,5$ мс; амплитуда – 1,7 мВ). Обе электрогенные фазы, скорее всего, отражают переход $\mathbf{P} \rightarrow \mathbf{F}$ в разных субпопуляциях фермента Glu445Ala [81]. Таким образом, замена Glu445 на Ala сильно ингибирует перенос заряда поперёк мембраны, сопряжённый с окислением цитохрома *bd*-I кислородом.

Аналогично, замена Glu107 на Leu в субъединице CydA ведёт к потере цитохромом bd-I хинолоксидазной активности. Полностью восстановленная мутантная форма Glu107Leu белка (**R**³) связывает О₂ примерно с той же скоростью, что и фермент дикого типа. Однако образование феррильного интермедиата (F) в мутантной оксидазе, как полагают, существенно замедляется в сравнении с ферментом дикого типа. Об этом свидетельствуют результаты спектрофотометрических экспериментов, согласно которым продукции соединения F в 100-микросекундной временной шкале у мутантной оксидазы не наблюдается, в отличие от белка дикого типа [83]. Этот вывод согласуется с тем фактом, что скорость генерации $\Delta \psi$ (основной фазы) мутантной оксидазой примерно в 350 раз ниже, чем таковая, измеренная для фермента дикого типа [83].

Glu445^{CydA}, по-видимому, протонируется при переходе гема b_{595} из окисленной в восстановленную форму, т.е. служит для компенсации отрицательного заряда электрона, пришедшего на гем. В случае гема *d* такую же роль, возможно, выполняет Glu107^{CydA}. Согласно опубликованной трёхмерной структуре цитохрома *bd*-I *E. coli*, гем b_{595} расположен вблизи периплазматической поверхности [55, 56]. Поэтому если H⁺ при восстановлении гема b_{595} поступает на Glu445^{CydA} с периплазматической стороны мембраны, то он вряд ли используется в катализируемой ферментом кислородоредуктазной реакции.

МОЖЕТ ЛИ ЦИТОХРОМ *bd*-II ИЗ *E. coli* ГЕНЕРИРОВАТЬ Δψ?

Функциональные исследования цитохрома *bd*-II *E. coli* пока находятся на самом начальном этапе. Bekker et al. [85] сообщили, что для фермента *bd*-II соотношение H^+/e^-

БИОХИМИЯ том 88 вып. 10 2023

равно 0, то есть он является несопряжённой хинолоксидазой. При этом известно, что цитохромы bd-I и $bo_3 E. coli - сопряжённые хинол$ оксидазы, со значениями Н⁺/e⁻ 1 и 2 соответственно [25, 26]. Bekker et al. сконструировали мутантный штамм E. coli MB37, в дыхательной цепи которого присутствовал цитохром bd-II, но отсутствовали все известные на тот момент первичные генераторы протонного потенциала: NADH-дегидрогеназа 1 (NDH-1), цитохром bo₃ и цитохром bd-I. Авторы вычисляли Н⁺/е⁻, используя сравнительные значения специфических скоростей потребления кислорода и синтеза ATP штамма MB37 с другими мутантными штаммами E. coli, для которых уже были измерены величины Н⁺/е⁻ [85]. Бактериальные клетки всех штаммов растили в одинаковых условиях, а скорость синтеза АТР рассчитывали из скоростей образования продуктов метаболизма – СО₂, ацетата, этанола и лактата. Неожиданным оказалось следующее наблюдение: штамм МВ37, который, по предположению авторов работы, должен был обладать полностью несопряжённой аэробной дыхательной цепью, оказался способен к росту в аэробных условиях на несбраживаемых субстратах. Однако возникает вопрос: как же в таком случае обеспечивается синтез ATP? Bekker et al. выдвинули гипотезу [85], согласно которой АТР в штамме МВ37 продуцируется исключительно за счёт субстратного фосфорилирования. В более поздней работе Shepherd et al. [86] предположили, что в этом мутантном штамме протонный потенциал образуется за счёт функционирования электрогенного антипортера, который переносит внутрь клетки анион глутаминовой кислоты (глутамат) в обмен на выброс из клетки нейтральной ү-аминомасляной кислоты (ГАМК). При этом ГАМК в клетке синтезируется из глутамата, в процессе чего потребляется внутриклеточный протон.

Borisov et al. [26] нашли неубедительными выводы авторов этих двух работ и экспериментально проверили, генерирует ли цитохром *bd*-II Δp . Обнаружили, что в стационарных условиях оба компонента $\Delta p - \Delta \psi$ и ΔpH образуются за счёт хинолоксидазной активности цитохрома bd-II [26]. Измерили соотношение H^+/e^- . Как и в случае цитохрома *bd*-I, оно оказалось равным 1 [26]. Также показали, что оксидаза *bd*-II способна генерировать $\Delta \psi$ в ходе одного молекулярного оборота фермента, предположительно, при переходах $\mathbf{P} \rightarrow \mathbf{F}$ и $\mathbf{F} \rightarrow \mathbf{A}^1$ [26]. Таким образом, можно заключить, что цитохром bd-II E. coli является первичным генератором Δp . Следовательно, для объяснения роста клеток штамма E. coli MB37 в аэробных условиях альтернативные механизмы образования ATP, предложенные в работах Bekker et al. и Shepherd et al. [85, 86], не требуются.

Финансирование. Исследование выполнено за счёт гранта Российского научного фонда № 22-24-00045 (https://rscf.ru/project/22-24-00045/).

Благодарность. Автор хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность М.И. Верховскому (безвременно ушедшему), И.Н. Белевичу, Н.П. Белевичу, Д.А. Блоху (безвременно ушедшему) и А. Ясайтису за то чудесное время, которое мы провели, измеряя электрогенную активность загадочного цитохрома *bd*.

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

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных, выполненных автором.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, 249, 321-324, doi: 10.1038/249321a0.
- Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461-470, doi: 10.1111/ j.1432-1033.1981.tb06361.x.
- Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Y., Skulachev, V. P., Arutjunjan, A. M., Shulalov, V. A., and Zaberezhnaya, S. M. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complex from *Rhodopseudomonas viridis, Eur. J. Biochem.*, **171**, 253-264, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13784.x.
- Mulkidjanian, A. Y., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Verkhovsky, M. I., and Drachev, L. A. (1990) Partial reversion of the electrogenic reaction in the ubiquinol: cytochrome c₂-oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores under neutral and alkaline conditions, *FEBS Lett.*, 277, 127-130, doi: 10.1016/0014-5793(90)80825-4.
- Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389-393, doi: 10.1016/0014-5793(93)80843-j.
- Konstantinov, A. A., Siletsky, S., Mitchell, D., Kaulen, A., and Gennis, R. B. (1997) The roles of the two proton input channels in cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* probed by the effects of site-directed mutations on time-resolved electrogenic intraprotein proton transfer, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 94, 9085-9090, doi: 10.1073/pnas.94.17.9085.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps couples to conversion of cytochrome *c* oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853-4861, doi: 10.1021/bi982614a.

- Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Verkhovskaya, M. L., Mamedov, M. D., and Skulachev, V. P. (2016) Real-time kinetics of electrogenic Na⁺ transport by rhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95, *Sci. Rep.*, 6, 21397, doi: 10.1038/ srep21397.
- Siletsky, S. A., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Borisov, V. B., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2021) His57 controls the efficiency of ESR, a lightdriven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1862, 148328, doi: 10.1016/j.bbabio.2020.148328.
- Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M., and Wikstrom, M. (1997) Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome-*c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 6-10, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00147-8.
- Gibson, Q., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.*, 86, 541-554, doi: 10.1042/bj0860541.
- 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.
- Azarkina, N. V., Borisov, V. B., Oleynikov, I. P., Sudakov, R. V., and Vygodina, T. V. (2023) Interaction of terminal oxidases with amphipathic molecules, *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 6428, doi: 10.3390/ijms24076428.
- Zharova, T. V., Grivennikova, V. G., and Borisov, V. B. (2023) F1·Fo ATP Synthase/ATPase: contemporary view on unidirectional catalysis, *Int. J. Mol. Sci.*, 24, 5417, doi: 10.3390/ijms24065417.
- 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.bbabio.2012.06.009.
- 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.

- Murali, R., Gennis, R. B., and Hemp, J. (2021) Evolution of the cytochrome *bd* oxygen reductase superfamily and the function of CydAA' in Archaea, *ISME J.*, **15**, 3534-3548, doi: 10.1038/s41396-021-01019-4.
- 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.
- 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.
- 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.bbabio.2011.06.016.
- Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffre, A., and Poole, R. K. (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.
- 22. 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.
- 23. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
- 24. Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus. ESP-0012-2015.
- 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.
- Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., Bloch, D. A., Han, H., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2011) Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17320-17324, doi: 10.1073/ pnas.1108217108.
- Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffre, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome bd, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, 56, 265-269.
- 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.
- 29. Giuffre, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacte-
- 8 БИОХИМИЯ том 88 вып. 10 2023

rial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1178-1187, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.01.016.

- Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: a potential target for next-generation antimicrobial agents, *Biochemistry (Moscow)*, 80, 565-575, doi: 10.1134/S0006297915050077.
- 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.
- Mobius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hannig, A. L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schroder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M., and Jahn, D. (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.
- Seregina, T. A., Lobanov, K. V., Shakulov, R. S., and Mironov, A. S. (2022) Inactivation of terminal oxidase bd-I leads to supersensitivity of *E. coli* to quinolone and beta-lactam antibiotics, *Mol. Biol. (Mosk)*, 56, 619-627, doi: 10.1134/S0026893322040100.
- Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabio. 2014.10.006.
- Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., and Giuffre, A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide, *FEBS Lett.*, **576**, 201-204, doi: 10.1016/ j.febslet.2004.09.013.
- Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu_B-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, **580**, 4823-4826, doi: 10.1016/j.febslet. 2006.07.072.
- Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2007) Redox control of fast ligand dissociation from *Escherichia coli* cytochrome *bd*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 97-102, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.118.
- Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K., and Cooper, C. E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, 5, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
- 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.

- Shepherd, M., Achard, M. E., Idris, A., Totsika, M., Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Ribeiro, C. A., Holyoake, L. V., Ladakis, D., Ulett, G. C., Sweet, M. J., Poole, R. K., McEwan, A. G., and Schembri, M. A. (2016) The cytochrome *bd*-I respiratory oxidase augments survival of multidrug-resistant *Escherichia coli* during infection, *Sci. Rep.*, 6, 35285, doi: 10.1038/ srep35285.
- Borisov, V. B., and Forte, E. (2022) Bioenergetics and reactive nitrogen species in bacteria, *Int. J. Mol. Sci.*, 23, 7321, doi: 10.3390/ijms23137321.
- 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.
- Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., Vicente, J. B., Sarti, P., and Giuffre, A. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, 6, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
- 44. 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **587**, 2214-2218, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.047.
- Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, 4, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.

- Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., Hoeser, J., Friedrich, T., Bald, D., and de Vries, S. (2016) Cytochrome *bd* displays significant quinol peroxidase activity, *Sci. Rep.*, 6, 27631, doi: 10.1038/srep27631.
- 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.
- Forte, E., Nastasi, M. R., and Borisov, V. B. (2022) Preparations of terminal oxidase cytochrome *bd*-II isolated from *Escherichia coli* reveal significant hydrogen peroxide scavenging activity, *Biochemistry (Moscow)*, 87, 720-730, doi: 10.1134/S0006297922080041.
- 55. Theßeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., Muller, R., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
- Safarian, S., Hahn, A., Mills, D. J., Radloff, M., Eisinger, M. L., Nikolaev, A., Meier-Credo, J., Melin, F., Miyoshi, H., Gennis, R. B., Sakamoto, J., Langer, J. D., Hellwig, P., Kuhlbrandt, W., and Michel, H. (2019) Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases, *Science*, **366**, 100-104, doi: 10.1126/science.aay0967.
- 57. Grauel, A., Kagi, J., Rasmussen, T., Makarchuk, I., Oppermann, S., Moumbock, A. F. A., Wohlwend, D., Muller, R., Melin, F., Gunther, S., Hellwig, P., Bottcher, B., and Friedrich, T. (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.
- Grund, T. N., Radloff, M., Wu, D., Goojani, H. G., Witte, L. F., Josting, W., Buschmann, S., Muller, H., Elamri, I., Welsch, S., Schwalbe, H., Michel, H., Bald, D., and Safarian, S. (2021) Mechanistic and structural diversity between cytochrome *bd* isoforms of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2114013118, doi: 10.1073/pnas.2114013118.
- 59. 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.
- 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.bbabio.2011.02.007.
- 61. 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.
- 62. 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-oxygenbinding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inihibition, *Microbiology*, **142**, 755-763, doi: 10.1099/00221287-142-4-755.

- 63. 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.
- 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.
- Siletsky, S. A., Zaspa, 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 73. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J. L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A., and

БИОХИМИЯ том 88 вып. 10 2023

Vos, M. H. (2002) Interactions between heme d and heme b_{595} in quinol oxidase bd from *Escherichia coli*: a photoselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry*, **41**, 1654-1662, doi: 10.1021/bi0158019.

- Arutyunyan, A. M., Borisov, V. B., Novoderezhkin, V. I., Ghaim, J., Zhang, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2008) Strong excitonic interactions in the oxygen-reducing site of *bd*-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes *d* and *b*₅₉₅ is 10 Å, *Biochemistry*, **47**, 1752-1759, doi: 10.1021/ bi701884g.
- 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.
- 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.bbabio.2009.05.003.
- Rappaport, F., Zhang, J., Vos, M. H., Gennis, R. B., and Borisov, V. B. (2010) Heme-heme and hemeligand 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.bbabio.2010.05.010.
- 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.
- Siletsky, S. A., Dyuba, A. V., Elkina, D. A., Monakhova, M. V., and Borisov, V. B. (2017) Spectralkinetic 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.
- Jasaitis, A., Borisov, V. B., Belevich, N. P., Morgan, J. E., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2000) Electrogenic reactions of cytochrome *bd*, *Biochemistry*, **39**, 13800-13809, doi: 10.1021/bi001165n.
- Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2005) Time-resolved electrometric and optical studies on cytochrome *bd* suggest a mechanism of electron-proton coupling in the di-heme active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3657-3662, doi: 10.1073/pnas.0405683102.
- Belevich, I., Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2007) Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28514-28519, doi: 10.1074/jbc.M705562200.
- 83. Borisov, V. B., Belevich, I., Bloch, D. A., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2008) Glutamate 107 in

БОРИСОВ

subunit I of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* is part of a transmembrane intraprotein pathway conducting protons from the cytoplasm to the heme b_{595} /heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907-7914, doi: 10.1021/bi800435a.

- 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.
- 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.
- 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.

MEMBRANE POTENTIAL GENERATION BY CYTOCHROME bd

Review

V. B. Borisov

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

This treatise gives an overview of current thinking on the mechanism of generation of a transmembrane electric potential difference $(\Delta \psi)$ during the catalytic cycle of a *bd*-type triheme terminal quinol oxidase. It is assumed that the main contribution to the $\Delta \psi$ formation is made by the movement of H⁺ across the membrane along the intraprotein hydrophilic proton-conducting pathway from the cytoplasm to the active site for oxygen reduction of this bacterial enzyme.

Keywords: respiratory chain, terminal oxidase, cytochrome bd, heme, protonmotive force, membrane potential