Том 86, выпуск 1, 2021

Том 86, выпуск 1, 2021 Специальный выпуск	
Посвящается памяти А.А. Константинова	
Памяти А.А. Константинова	3
Сотрудничество с Александром Константиновым в исследовании механизмов электрогенных реакций в бактериальных фотосинтетических реакционных центрах (мини-обзор) О.П. Каминская, А.Ю. Семенов	6
Молекулярная биология цитохромов <i>Bacillus subtilis</i> на 2020 год (обзор) Л. Хедерштедт	14
Терминальная оксидаза цитохром <i>bd</i> защищает бактерии от токсического воздействия сероводорода (обзор) <i>В.Б. Борисов, Е. Форте</i>	30
Молекулярные и функциональные последствия утраты субъединицы 8А цитохром <i>с</i> -оксидазы Д. Ротко, А.П. Кудин, Г. Цурска, Б. Кулавяк, А. Шевчык, В.С. Кунц	43
Механизм ингибирования цитохром <i>с</i> -оксидазы тритоном X-100 И.П. Олейников, Н.В. Ацаркина, Т.В. Выгодина, <u>А.А. Константинов</u>	56
Специфические эффекты анионов на щелочное состояние цитохрома с Е. Седлак, Т. Кожар, Р. Вархач, А. Мусатов, Н. Томашкова	73
Термодинамика феррильной формы Р-типа цитохром с-оксидазы быка Л. Микулова, И. Пекова, Д. Янкура, М. Ступак, М. Фабиан	89
Загадка 2-Суѕ-пероксиредоксинов: какова их роль в клетке? (обзор) <i>А.В. Пескин, К.С. Уинтерборн</i>	100
Структурно-функциональные аспекты терморегуляции электронного транспорта и синтеза АТР в хлоропластах (обзор) <i>А.В. Вершубский, А.Н. Тихонов</i>	109
Электрометрическое изучение с временным разрешением перехода F→O цитохром <i>с</i> -оксидазы. Влияние ионов Zn ²⁺ на положительной стороне мембраны <i>С.А. Силецкий, Р.Б. Геннис</i>	125

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 1, 2021

=

=

Special Issue Dedicated to the memory of A. A. Konstantinov				
In memory of A. A. Konstantinov	3			
The Mechanisms of Electrogenic Reactions in Bacterial Photosynthetic Reaction Centers: Studies in Collaboration with Alexander Konstantinov (Mini-Review) O. P. Kaminskaya and A. Yu. Semenov	6			
Molecular Biology of <i>Bacillus subtilis</i> Cytochromes <i>anno</i> 2020 (Review) L. Hederstedt	14			
Terminal Oxidase Cytochrome <i>bd</i> Protects Bacteria against Hydrogen Sulfide Toxicity (Review) <i>V. B. Borisov and E. Forte</i>	30			
Molecular and Functional Effects of Loss of Cytochrome c Oxidase Subunit 8A D. Rotko, A. P. Kudin, G. Zsurka, B. Kulawiak, A. Szewczyk, and W. S. Kunz	43			
Mechanism of Inhibition of Cytochrome <i>c</i> Oxidase by Triton X-100 <i>I. P. Oleynikov, N. V. Azarkina, T. V. Vygodina, and</i> A. A. Konstantinov	56			
Anions Specific Effects on Alkaline State of Cytochrome c E. Sedlák, T. Kožár, R. Varhač, A. Musatov, and N. Tomášková	73			
Thermodynamics of the P-Type Ferryl Form of Bovin Cytochrome c Oxidase L. Mikulova, I. Pechova, D. Jancura, M. Stupak, and M. Fabian	89			
The Enigma OF 2-Cys Peroxiredoxins: What Are Their Roles? (Review) A. V. Peskin and C. C. Winterbourn	100			
Structural and Functional Aspects of Electron Transport Thermoregulation and ATP Synthesis in Chloroplasts (Review) <i>A. V. Vershubskii and A. N. Tikhonov</i>	109			
Time-Resolved Electrometric Study of F \rightarrow O Transition in Cytochrome <i>c</i> Oxidase. The Effect of Zn ²⁺ Ions on the Positive Side of the Membrane <i>S. A. Siletsky and R. B. Gennis</i>	125			



ПАМЯТИ АЛЕКСАНДРА АЛЕКСАНДРОВИЧА КОНСТАНТИНОВА

1 мая 2020 года на 71 году жизни после тяжелой болезни умер один из самых ярких и талантливых сотрудников НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского Московского государственного университета, доктор биологических наук, профессор Александр Александрович Константинов.

Александр родился 2 июня 1949 г. в Москве в семье биологов. Отец, Александр Степанович Константинов, и мать, Наталья Сергеевна Константинова (Юркевич), – оба выпускники Биологического факультета Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова, где и познакомились. Александр Степанович в последние годы был профессором кафедры ихтиологии Биологического факультета МГУ, а Наталья Сергеевна всю жизнь проработала во Всесоюзном НИИ вирусологии «Микроб» (г. Саратов). Вскоре после рождения сына семья переехала в г. Саратов, где Александр закончил школу. В 1967 г. он, как и его родители, поступил в Московский государственный университет. В 1972 г. он закончил кафедру биохимии растений (молекулярной биологии) Биологического факультета МГУ, затем аспирантуру, и с 1975 г. до последнего дня работал в НИИ Физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, МГУ.

Александр принадлежал к одному из первых поколений учеников В.П. Скулачева, приняв-

ших активное участие в обосновании хемиосмотической теории Митчелла. Круг его научных интересов был связан с изучением механизма переноса зарядов в электрон-транспортных цепях митохондрий и бактерий. Его исследования внесли существенный вклад в понимание механизма работы практически всех ферментов дыхательной цепи за исключением NADH:хиноноксидоредуктазы, комплекса I. В 1970–1980 гг. использование комбинации ингибиторов антимицина и миксотиазола позволило обосновать циклический механизм переноса электронов комплексом bcl и, таким образом, экспериментально подтвердить гипотезу Q-цикла Митчелла. В 1976 г., используя метод ЭПР, Александр Александрович совместно с сотрудниками физфака МГУ Э.К. Рууге и А.Н. Тихоновым открыл существование стабильных свободнорадикальных форм убихинона в том же bc1-звене дыхательной цепи митохондрий, а также выяснил механизм образования кислородных радикалов в этом участке за счет самоокисления нестабильного радикала убихинона при ингибировании антимицином переноса электрона с убихинона на низкопотенциальный гем b_L в центре «i». В 1977 г. он совместно с А.В. Пескиным и И.Б. Збарским обнаружили низкую супероксиддисмутазную активность в раковых клетках. В те же годы группа исследователей во главе с Л.А. Драче-

вым, в составе которой был А.А. Константинов, впервые использовала прямой электрометрический метод измерения генерации мембранного потенциала для изучения фотоиндуцированных электрических процессов в реакционных центрах хроматофоров Rhodospirillum rubrum и Rhodopseudomonas viridis. В 1980 г. эти работы были удостоены премии Ленинского комсомола по науке. В 90-е годы успешное сотрудничество с проф. Л. Хедерштедтом (Университет г. Лунд, Швеция) позволило показать, что химический аналог семихинона HQNO в сукцинат:менахинон-оксидоредуктазе из Bacillus subtilis не только ингибирует активность, но и вызывает спектральные изменения в двугемовом цитохроме b, представляющем собой трансмембранную часть комплекса, а также меняет потенциал полувосстановления низкопотенциального гема b_1 , расположенного у наружной поверхности мембраны. Эти данные подтверждали гипотезу о том, что мембранный менахинон связывается с ферментом вблизи гемма $b_{\rm L}$, и его восстановление является электрогенным процессом, требующим затраты $\Delta \mu H^+$, что внесло важный вклад в понимание механизма работы сукцинатдегидрогеназ из бацилл.

В последние 30 лет основное внимание Александр Александровича было сфокусировано на изучении терминальных оксидаз дыхательной цепи, среди которых, прежде всего, цитохромсоксидаза (ЦО) из Rhodobacter sphaeroides и митохондрий сердца быка, хинол-оксидаза bd-типа из E. coli и Azotobacter vinelandii, ba₃оксидаза из Thermus thermophilus и bb'-оксидаза из Bacillus subtilis. А.А. Константинов впервые предложил использовать прямой электрометрический метод (1993 г.) для изучения быстрой кинетики генерации потенциала, индуцированного лазерной вспышкой на мембране протеолипосом с ЦО. Позже метод прямой электрометрии был с успехом применен в лаборатории Александра Александровича для изучения отдельных электрогенных стадий внутрибелкового переноса заряда в каталитическом цикле ЦО и других, упомянутых выше, терминальных оксидаз и расшифровки механизма их работы. Использование прямой электрометрии на бактериальных мутантах по входным протонным каналам, обнаруженным в структуре ЦО, позволило определить их роль в каталитическом цикле фермента. Мутанты были предоставлены проф. Б. Геннисом (Иллинойский университет, Урбана-Шампейн, США). По названию ключевых аминокислотных остатков А.А. Константинов предложил называть каналы К- и D-, что впоследствии закрепилось в литературе. Работы выполнялись также в сотрудничестве с М. Верховским из лаборатории проф. М. Викстрема (Университет г. Хельсинки, Финляндия), где была собрана аналогичная установка по измерению генерации мембранного потенциала методом прямой электрометрии. Сейчас прямой электрометрический метод используется в нескольких зарубежных лабораториях и признан международным сообществом как один из передовых и эффективных методов изучения механизма работы терминальных оксидаз.

В ходе совместных исследований с проф. С. Папа и Р. Капитаньо (Университет г. Бари, Италия) А.А. Константинову удалось найти простой способ регистрации пероксидазной активности ЦО в аэробных условиях, используя в качестве доноров соединения с потенциалом >400 мВ, например буфер ферро/феррицианид. Наряду с прямой электрометрией, пероксидазная активность оказалась удобным инструментом изучения механизма работы ЦО. Тестирование ключевого мутанта по К-каналу на пероксидазную активность показало, что она сохраняется при практически полном ингибировании общей каталитической активности фермента. Таким образом, для пероксидазной реакции К-канал оказался не нужен, поскольку протоны доставляются в фермент самой перекисью. Это позволило А.А. Константинову разделить каталитический цикл ЦО на две независимые фазы: «эу-оксидазную» (восстановление ЦО и образование из кислорода перекиси, связанной в активном центре), которая обслуживается К-каналом, и «пероксидазную» (превращение связанной перекиси в воду, аналогично реакции, катализируемой пероксидазами), которая обслуживается D-каналом. Александр Александрович даже называл ЦО «помпирующей пероксидазой», чтобы подчеркнуть важное отличие от обычных пероксидаз.

В последние годы Александр Александрович переключил свое внимание на механизмы регуляции ЦО. Было исследовано ингибирование ЦО ионами Zn^{2+} и Ca^{2+} . Показано, что имеется 2 места действия Zn^{2+} , что разрешило имевшееся в литературе противоречие между данными разных авторов. Близость сайта связывания Ca²⁺ к выходной части так называемого протонного канала Н в структуре ЦО из сердца быка позволило предположить, что он может регулировать транспорт протонов и/или ионное равновесие внутри канала. Александр Александрович также обратил внимание, что в физиологической среде константа ингибирования ЦО Ca^{2+} имеет ту же величину, что K_{M} активации кальцием митохондриального кальциевого унипортера. Таким образом, ингибирование ЦО кальцием может моделировать захват Ca²⁺

митохондриями через унипортер с последующим открытием поры.

В течение многих лет А.А. Константинов возглавлял лабораторию электронного транспорта в биологических системах и был крупнейшим специалистом в области изучения механизма переноса зарядов в электрон-транспортных цепях митохондрий и бактерий Он был руководителем 14 кандидатских диссертаций, воспитал плеяду талантливых учеников, многие из которых успешно продолжают научные исследования в России и за рубежом. В 2008 году президиума РАН наградил А.А. Константинова премией имени А.Н. Баха – за выдающиеся работы по *биохимии*.

Александр Константинов был широко признан и высоко оценен мировым научным сообществом. Он являлся членом редколлегий журналов Биохимия (с 1992 г.) и Biochimica et Biophysica Acta (1990-1999). Александр был международным ученым-исследователем Медицинского Института Говарда Хьюза (2000–2010 гг.). руководителем международных научных проектов, включая гранты Howard Hughes, CRDF, INTAS, приглашенным докладчиком на многих престижных международных конференциях и симпозиумах. Он был одним из самых цитируемых российских ученых, стипендиатом программы «Выдающиеся ученые России» (1994-1996; 1997-1999 и 2000-2002 гг.). Его блестящие работы публиковались в журналах с высоким импакт-фактором, включая PNAS, JBC, BBA-Bioenergetics, Biochemistry, PLoS One, FEBS Letters и других.

В течение почти 20 лет (с 2002 г.) Александр Александрович был приглашенным профессором Института Химических и Биологических Технологий Нового Лиссабонского Университета (ITQB NOVA, Португалия). После его смерти на сайте Университета появился некролог, написанный профессором Мигелем Сепульведа Текшейра.

Помимо науки, Александр очень серьезно увлекался классической музыкой, был прекрасным скрипачом. С 1968 г., студентом первого курса, Александр начал играть в Камерном оркестре МГУ под руководством Э. Гиндина, с 1971 г. стал концертмейстером, а с 1991 г. – бессменным художественным руководителем этого замечательного коллектива, музыканты которого одними из первых в России начали исполнять барочную музыку в аутентичной манере. До самого последнего времени он организовывал работу оркестра, определял его репертуар и участвовал в концертах. Под его руководством Камерный оркестр МГУ стал лауреатом I и II Всесоюзных фестивалей самодеятельного творчества. Перед концертами Александр Александрович проводил музыкально-образовательный лекторий: знакомил слушателей с историей музыкальных произведений, которые будут исполняться оркестром, интересно рассказывал о создавших их композиторах, наигрывал основные музыкальные темы. Это помогало всестороннему и глубокому восприятию произведений, поэтому на концертах Камерного оркестра всегда было много слушателей.

Нам, друзьям, коллегам и ученикам Александра Александровича, Саши, трудно примириться с тем, что такого яркого и неординарного человека больше нет. Память о нем надолго сохранится в наших сердцах.

Этот номер, содержащий статьи его коллег, друзей и соавторов, посвящен памяти Александра Александровича Константинова и открывает нам широкий круг его научных интересов.

Редакция и редакционная коллегия журнала «Биохимия»

УДК 577.355

СОТРУДНИЧЕСТВО С АЛЕКСАНДРОМ КОНСТАНТИНОВЫМ В ИССЛЕДОВАНИИ МЕХАНИЗМОВ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ РЕАКЦИЙ В БАКТЕРИАЛЬНЫХ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ

Мини-обзор

© 2021 О.П. Каминская¹, А.Ю. Семенов^{2,3}*

¹ Институт фундаментальных проблем биологии РАН ФИЦ «Пущинский научный центр биологических исследований РАН», 142290 Пущино, Московская обл., Россия

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: semenov@belozersky.msu.ru

³ Федеральный исследовательский центр химической физики им. Н.Н. Семенова РАН, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 15.10.2020 После доработки 11.11.2020 Принята к публикации 21.11.2020

Рассмотрены работы авторов 1985–1988 гг., выполненные в сотрудничестве с А.А. Константиновым, одним из крупнейших ученых в области мембранной биоэнергетики. Работы, посвященные исследованию быстрой кинетики генерации мембранного потенциала в фотосинтетических реакционных центрах (РЦ) пурпурных бактерий в ответ на лазерную вспышку, позволили детально изучить механизмы электрогенных реакций на донорном и акцепторном участках РЦ. На протеолипосомах, содержащих РЦ из несерных пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum*, была выявлена электрогенная стадия, связанная с внутрибелковым переносом электрона к фотоокисленному димеру бактериохлорофилла P₈₇₀ от экзогенных вторичных доноров – редокс-красителей и растворимых цитохромов (цит) типа *с*. Обнаружено, что восстановление вторичного хинонного акцептора электрона Q_в в хроматофорах из *R. rubrum* в ответ на четные вспышки света, сопровождающееся протонированием хинона, имеет электрогенный характер. Были определены спектральные характеристики и окислительно-восстановительные потенциалы четырех гемов прочносвязанного цит *с* в РЦ *Blastochloris viridis* и стадии электрогенеза, связанные с переносом электрона в комплексе РЦ. Впервые было проведено сопоставление относительных амплитуд мембранного потенциала, генерируемого в ходе отдельных электрогенных амплитуд между редокс-кофакторами, полученными на основе трехмерной структуры РЦ *Bl. viridis*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: бактериальные фотосинтетические реакционные центры, перенос электрона, прямой электрометрический метод, мембранный потенциал, цитохром *с*, хинон. **DOI:** 10.31857/S0320972521010012

КРАТКИЙ ОБЗОР ПРЕДШЕСТВОВАВШИХ РАБОТ ПО ИССЛЕДОВАНИЮ ЭЛЕКТРОГЕННЫХ РЕАКЦИЙ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ БАКТЕРИЙ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ПРЯМОГО ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОГО МЕТОДА

В 1985—1988 гг. авторы этой статьи сотрудничали с Александром Александровичем Константиновым в изучении природы и механизмов электрогенных реакций в хроматофорах и фотосинтетических реакционных центрах (РЦ), выделенных из несерных пурпурных бактерий *Rhodospirillum rubrum и Rhodobacter* (прежнее название – *Rhodopseudomonas*) sphaeroides и из серных пурпурных бактерий *Blastochloris* (прежнее название – *Rhodopseudomonas*) viridis [1–6]. В 1974–1976 гг. Л.А. Драчевым, А.Д. Кауленом и одним из авторов настоящего обзора (А.С.) был разработан прямой электрометрический метод регистрации электрической активности мемб-

* Адресат для корреспонденции.

Принятые сокращения: ДАД – 2,3,5,6-тетраметил-п-фенилендиамин (диаминодурен); РЦ – реакционные центры; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин; ФМС – феназинметосульфат; цит – цитохром; E_m – среднеточечный редокс-потенциал; $\Delta \psi$ – трансмембранная разность электрических потенциалов; P_{870} (P_{960}) – димеры бактериохлорофилла в РЦ; Q_A , Q_B – первичный и вторичный хинонные акцепторы электрона; τ – характерное время реакции.

ранных белков [7, 8]. С помощью этого метода было установлено, что в бактериальных хроматофорах, ассоциированных с искусственной плоской фосфолипидной мембраной, при стационарном освещении в присутствии редокс-медиаторов наблюдается образование трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta \psi$) со знаком плюс внутри хроматофоров [9, 10].

Было обнаружено, что в такой системе фотоиндуцированный перенос электронов ограничен восстановлением первичного хинонного акцептора Q_A, предположительно вследствие вымывания вторичного хинона Q_в и эндогенного пула убихинона в объем липидной фазы искусственной мембраны [9-11]. Показано, что экзогенные редокс-кофакторы – доноры и акцепторы электрона (аскорбат, N,N,N',N'-тетраметилп-фенилендиамин (ТМФД), диаминодурен (ДАД), феназинметосульфат (ФМС), 2,6-дихлорфенолиндофенол (ДХФИФ), метиленовый синий, искусственные хиноны) – поддерживают стационарный фотопотенциал, обеспечивая многократное ревосстановление фотоокисленного первичного донора РЦ – димера бактериохлорофилла P_{870} – и реокисление фотовосстановленного Q_A [10].

Применение коллодиевой пленки в качестве каркаса для плоской фосфолипидной мембраны позволило регистрировать кинетику генерации $\Delta \psi$ в ответ на лазерную вспышку с временным разрешением ~200 нс [12]. В работах этого периода, выполненных в лаборатории Л.А. Драчева [11-15], было показано, что освещение хроматофоров пурпурных бактерий одиночной лазерной вспышкой вызывает быстрое, не разрешаемое по кинетике, образование $\Delta \psi$. Показано, что наблюдаемая быстрая стадия обусловлена переносом электрона между P₈₇₀ (или P₈₉₀ в случае хроматофоров из серных пурпурных Chromatium minutissimum бактерий и Ectothiorhodospira shaposhnikovii) и первичным хинонным акцептором Q_A. Кроме того, в хроматофорах C. minutissimum и E. shaposhnikovii, РЦ которых имеет в своем составе прочносвязанный четырехгемовый цитохром (цит) с, наблюдалась дополнительная стадия образования $\Delta \psi$, связанная с восстановлением фотоокисленного P_{890} от цит *c*. Было предположено, что вклад в генерацию $\Delta \psi$ может вносить и реакция окисления Q_A – либо при переносе электрона на внешний акцептор, либо при восстановлении вторичного хинонного акцептора Q_в.

Исследования показали, что $\Delta \psi$, генерируемая встроенными в коллодиевую фосфолипидную мембрану хроматофорами в ответ на единичную вспышку, спадает с гетерогенной кинетикой в шкале десятков миллисекунд—секунд [13, 14]. Было предположено, что быстрая компонента спада $\Delta \psi$ обусловлена рекомбинацией зарядов между фотоокисленным P_{870}^+ и восстановленным Q_A^- . Медленная компонента спада $\Delta \psi$ с характерным временем $\tau \ge 0,5$ с отражала процесс пассивного разряда $\Delta \psi$ на искусственной мембране и мембране хроматофора. Было обнаружено, что спад $\Delta \psi$ замедлялся в присутствии восстановленного ФМС.

АНАЛИЗ КИНЕТИКИ СПАДА ФОТОЭЛЕКТРИЧЕСКОГО ОТВЕТА ХРОМАТОФОРОВ *R. rubrum* И ПРОТЕОЛИПОСОМ С РЦ *R. rubrum*, ВСТРОЕННЫХ В КОЛЛОДИЕВУЮ ФОСФОЛИПИДНУЮ МЕМБРАНУ

Работы 1985—1988 гг., выполненные нами в сотрудничестве с А.А. Константиновым [1–6], посвящены детальному исследованию кинетики нарастания и спада мембранного потенциала, генерируемого фотосинтетическими РЦ пурпурных бактерий в ответ на лазерную вспышку. Большой вклад в экспериментальную часть этих работ внесли С.М. Драчева и М.Д. Мамедов.

С использованием метода парных вспышек нами было доказано, что быстрая компонента спада индуцированного лазерной вспышкой фотопотенциала с т ~ 70 мс в хроматофорах *R. rubrum*, ассоциированных с коллодиевой мембраной, обусловлена возвратом электрона от Q_A⁻ к P₈₇₀ [4]. Показано, что вклад медленной $(\tau \ge 0.5 \text{ c})$ компоненты в кинетику спада $\Delta \psi$ увеличивается в присутствии эффективных доноров и акцепторов электрона, способных восстанавливать либо окислять компоненты ион-радикальной пары $P_{870}^+Q_A^-$ и, как следствие, образовывать долгоживущие состояния $P_{870}Q_A^-$ и $P_{870}^+Q_A$. Было продемонстрировано, что относительная амплитуда медленной компоненты темнового спада $\Delta \psi$ может быть использована для оценки скорости восстановления P₈₇₀ и окисления Q_A⁻ экзогенными редокс-кофакторами. Показано, что эффективными восстановителями для P_{870}^+ являются редокс-медиаторы ТМФД, ДАД, ФМС, ДХФИФ, а эффективными акцепторами электрона от Q_A⁻ – 1,4-бензохинон, растворимые аналоги убихинона Q-1 и Q-2, а также убихинон-10 (Q-10), добавляемый в раствор фосфолипидов в н-декане, применявшийся для пропитки коллодиевой пленки [4].

Данные о том, что экзогенный убихинон способен быстро реокислять Q_A^- и тем самым предотвращать рекомбинацию ион-радикальной пары, указывали на реконструкцию функции Q_B в системе встроенных хроматофоров.

При насыщающих концентрациях убихинона в коллодиевой мембране реакция $Q_A^- \rightarrow Q_B$ реконструировалась в 75% РЦ [4]. Замедление спада $\Delta \psi$, вызванное добавлением Q-10, полностью снималось ингибитором сайта Q_B о-фенантролином. Эти эксперименты подтвердили первоначальное предположение о том, что ингибирование переноса электрона с Q_A на Q_B в хроматофорах, встроенных в искусственную фосфолипидную мембрану, обусловлено экстракцией убихинона, связанного в сайте Q_B , в гидрофобный объем искусственной мембраны [9, 10].

В экспериментах на хроматофорах *R. rubrum* в качестве доноров электрона для фотоокисленного Р₈₇₀ необходимо было использовать проникающие через мембрану восстановленные редокс-медиаторы, поскольку донорный участок белкового комплекса РЦ локализован вблизи внутренней поверхности мембраны хроматофоров. Мы показали, что для исследования редокс-реакций P⁺₈₇₀ с непроникающими донорами электрона удобной моделью могут служить протеолипосомы, содержащие изолированные РЦ из R. rubrum [3]. В таких протеолипосомах в ответ на лазерную вспышку генерируется фотопотенциал со знаком минус внутри везикул, что указывает на локализацию P₈₇₀ вблизи от наружной поверхности протеолипосомальной мембраны, т.е. противоположную его локализации в хроматофорах *R. rubrum*. Добавление к протеолипосомам с РЦ из R. rubrum непроникающих доноров электрона – гексааминорутения и цит с из сердца лошади – приводило к значительному замедлению спада $\Delta \psi$, генерируемой в ответ на лазерную вспышку. Этот факт свидетельствовал о быстром восстановлении фотоокисленного Р₈₇₀ экзогенными редокс-кофакторами и появлении долгоживущего состояния P₈₇₀Q₋.

ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ НА ДОНОРНОМ УЧАСТКЕ РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРОВ ИЗ *Rhodospirillum rubrum*

Исследование электрогенеза, связанного с переносом электрона между первичным донором РЦ P_{870} и растворимым цит *c*, затруднено в случае хроматофоров из *R. rubrum*, поскольку эти замкнутые везикулы теряют значительную часть эндогенного цит *c*₂ при ультразвуковой обработке, при этом ориентированный внутрь хроматофора донорный участок РЦ недоступен для экзогенного цит *c*. Поэтому для исследования электрогенного восстановления P_{870}^+ цитохромами типа *с* мы использовали протеолипосомы, содержащие изолированные комплексы РЦ из *R. rubrum*.

В работе Drachev et al. [3] впервые с высоким разрешением была измерена быстрая кинетика генерации мембранного потенциала в ходе восстановления Р₈₇₀ от цит с из сердца лошади и от цит c_2 , выделенного из *R. rubrum*. Было показано, что в присутствии ≥ 0,1 мкМ восстановленного цит *c* в кинетике нарастания $\Delta \psi$, помимо не разрешаемой по времени быстрой стадии А ($\tau < 0,2$ мкс), обусловленной разделением зарядов между P₈₇₀ и Q_A, наблюдается дополнительная компонента с характерным временем т в субмиллисекундной либо миллисекундной временной шкале, связанная с донированием электрона от цит с (стадия С). Было обнаружено, что относительный вклад этой дополнительной компоненты нарастания $\Delta \psi$ в суммарный электрогенез составляет 22-24% в присутствии митохондриального цит с (при его концентрации > 5-10 мкМ) и ~16% – в присутствии 7 мкМ цит c₂ из R. rubrum. Кинетический анализ стадии С свидетельствовал о насыщаемой реакции второго порядка между цит с и Р₈₇₀ с максимальным значением константы скорости $k_{v max}$ = = $6 \cdot 10^3$ с⁻¹ и константой Михаэлиса $K_{\rm M}$ = 0,9 мкМ при низкой ионной силе. Скорость нарастания стадии С заметно снижалась при повышении ионной силы, что соответствует представлению об ионном механизме взаимодействия белка РЦ с цит с при образовании бимолекулярного комплекса.

Важным этапом исследований электрогенеза в РЦ фотосинтезирующих бактерий явилось понимание того, что электрогенный характер восстановления Р₈₇₀ не является специфичным для растворимых цитохромов типа с как доноров электрона, а имеет место и в случае восстановленных форм редокс-медиаторов ТМФД, ДАД и ФМС. В присутствии высоких концентраций ФМС и ТМФД, соответственно > 20 мкМ и > 0,5 мМ, в шкале от сотен микросекунд до миллисекунд в хроматофорах *R. rubrum* в ответ на единичную вспышку появлялась дополнительная стадия нарастания $\Delta \psi$ с вкладом 15-18% в суммарный электрогенез [1]. Характерное время τ этой дополнительной компоненты нарастания $\Delta \psi$ составляло ~250 мкс при концентрации ФМС 50 мкМ и ~2 мс - при концентрации ТМФД 4 мМ. Электрогенный характер восстановления P_{870}^+ низкомолекулярными донорами электрона свидетельствовал об электроизолированном расположении специальной пары в глубине белковой глобулы РЦ. Поскольку амплитуда дополнительной фазы нарастания $\Delta \psi$, обусловленной донированием электрона от восстановленного ТМФД или ФМС, была лишь немногим меньше амплитуды фазы С, наблюдаемой в присутствии цит с, было сделано

заключение, что основной вклад в электрогенез, связанный с восстановлением P_{870}^+ , вносит векторный перенос электрона внутри белковой глобулы самого РЦ.

ГЕНЕРАЦИЯ Δψ ХРОМАТОФОРАМИ *R. rubrum* ПРИ ПЕРЕНОСЕ ЭЛЕКТРОНА НА АКЦЕПТОРНОМ УЧАСТКЕ РЦ

Возможность реконструкции функции Q_в в хроматофорах, ассоциированных с коллодиевой мембраной, позволила изучить вопрос об электрогенезе, связанном с окислением Q_A вторичным хиноном Q_в [2]. Наши исследования показали, что перенос первого электрона от Q_A к Q_B $(Q_{A}^{-}Q_{B} \rightarrow Q_{A}Q_{B}^{-})$ в хроматофорах *R. rubrum* не приводит к увеличению Δψ. Эти данные соответствовали заключению предшествовавшего исследования электрогенеза в РЦ *Rba. sphaeroides*, встроенных в плоскую бислойную мембрану [16] (позже была выявлена небольшая рН-зависимая электрогенная стадия, обусловленная протонированием аминокислотного остатка вблизи Q_в при образовании Q_в в ответ на единичную вспышку [17]). Вместе с тем мы обнаружили, что восстановление семихинонной формы Q_в до убихинола связано с появлением дополнительной компоненты $\Delta \psi$, составляющей ~10% суммарной амплитуды ответа (стадия В) [2]. Эти данные явились первым свидетельством электрогенеза, сопряженного с протонированием вторичного хинона в бактериальных РЦ.

Электрогенная стадия В, связанная с образованием Q_BH_2 , характеризовалась т 130 мкс, 250 мкс и ~1 мс при рН 6,5, 7,5 и 9 соответственно [2], что близко к величинам, измеренным для скорости переноса электрона от Q_A к Q_B в хроматофорах *R. rubrum* и РЦ *Rba. sphaeroides* [18, 19] и скорости антимицин-нечувствительного связывания H⁺ в хроматофорах *Rba. sphaeroides* [20] (см. также обзоры [21, 22]). Тот факт, что протонирование Q_B при образовании убихинола в ответ на вторую вспышку сопряжено с генерацией $\Delta \psi$, указывает на векторный перенос H⁺ из внешней водной фазы к электроизолированному хинону Q_B , заглубленному внутрь белковой глобулы РЦ.

Рис. 1 суммирует данные по электрогенным реакциям в РЦ *R. rubrum*, полученные в работах Drachev et al. [1–4]. Схема показывает три стадии электрогенеза на мембране хроматофора, сопряженного с переносом электрона в комплексе РЦ. Стадия А обусловлена первичным разделением зарядов, В – протонированием восстановленного Q_B при образовании убихинола, С – восстановлением димера бактериохлорофилла от растворимых доноров электрона.



Рис. 1. Схема электрогенных реакций в реакционных центрах *R. rubrum*. Электрогенное восстановление фотоокисленного P_{870} от экзогенных вторичных доноров электрона наблюдается в ответ на каждую лазерную вспышку, электрогенное протонирование вторичного хинонного акцептора Q_B – в ответ на четные вспышки света. Указаны характерные времена т (для компоненты B – при pH 7,5) и относительные вклады трех стадий генерации $\Delta \psi$

ПЕРЕНОС ЭЛЕКТРОНА И ЭЛЕКТРОГЕННЫЕ РЕАКЦИИ В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ ИЗ Blastochloris viridis

Работы Dracheva et al. [5, 6], выполненные с участием А.А. Константинова, были посвящены исследованию переноса электрона и электрогенных реакций в РЦ, выделенных из серных пурпурных бактерий *Bl. viridis*. Интерес к изучению именно этих РЦ обусловлен двумя обстоятельствами. Во-первых, именно для этого пигмент-белкового комплекса была получена первая трехмерная структура кристалла мембранного белка с атомным разрешением [23, 24]. Вовторых, вторичным донором электрона для димера бактериохлорофилла в этих РЦ служит не водорастворимый цит c_2 , как в РЦ из несерных бактерий *R. rubrum* и *Rba. sphaeroides*, а прочносвязанный с РЦ четырехгемовый цит *c*.

До начала этих работ считалось, что четырехгемовый цит с в РЦ *Bl. viridis* содержит по два одинаковых высокопотенциальных и низкопотенциальных гема со среднеточечными редокс-потенциалами E_m +340 и 0 мВ и максимумами поглощения соответственно при 558 и 552-553 нм [25, 26]. Нами было показано, что как высокопотенциальные, так и низкопотенциальные гемы не идентичны и характеризуются различными спектральными и окислительновосстановительными свойствами [5, 6]. Гемы с E_m +380, +310, +20 и -60 мВ характеризовались максимумами поглощения при 559, 556, 552 и 554 нм соответственно. Ранее было показано, что аксиальными лигандами гема, расположенного вторым по счету от P_{960} в РЦ *Bl. viridis*, служат аминокислотные остатки гистидинов, что является характерным признаком низкопотенциального гема [24, 27]. Измерения с помощью импульсной абсорбционной спектрометрии кинетики переноса электрона в РЦ из Bl. viridis показали, что в физиологических условиях (когда гемы c_{559} и c_{556} восстановлены) непосредственным донором электрона для фотоокисленного P_{960} служит гем c_{559} ($\tau = 0,3$ мкс), в то время как гем с556, в свою очередь, восстанавливает гем c_{559} ($\tau = 2,5$ мкс) [5]. Поэтому мы предположили, что высокопотенциальные и низкопотенциальные гемы цит с чередуются, и ближайшим к Р₉₆₀ является наиболее высокопотенциальный гем c_{559} , а второй высокопотенциальный гем c_{556} является третьим по счету от P₉₆₀. В этом случае редокс-центры должны быть расположены в следующей последовательности: $c_{554} - c_{556}$ $c_{552} - c_{559} - P_{960}$ [6] (рис. 2).

Для исследования электрогенных реакций протеолипосомы, содержащие РЦ из *Bl. viridis*,

были встроены в коллодиевые фосфолипидные мембраны. Анализ фотоэлектрических сигналов, индуцированных лазерными вспышками, показал, что кинетика образования $\Delta \psi$ включает три последовательные электрогенные реакции, наблюдаемые в ответ на каждую лазерную вспышку: А – не разрешаемый по времени перенос электрона от Р₉₆₀ на первичный хинонный акцептор Q_A ($\tau < 0,2$ мкс), C1 – восстановление фотоокисленного P_{960}^+ от самого высокопотенциального гема c_{559}^{2+} ($\tau = 0,3$ мкс), C2 – ревосстановление окисленного c_{559}^{3+} от второго высокопотенциального гема c_{556}^{2+} ($\tau = 2,5$ мкс), и компоненту В, наблюдаемую в ответ на четные вспышки и связанную с протонированием дважды восстановленного вторичного хинонноакцептора Q_B с образованием $Q_B H_2$ го (т = 400 мкс) [6]. Относительный вклад кинетических стадий С2, С1, А и В в суммарный электрогенез составлял 5, 15, 70 и 10% соответственно (рис. 2). Полученные результаты показывают, что относительный вклад электрогенных стадий возрастает в центральной гидрофобной области белка и снижается на периферических участках.

Первые данные рентгеноструктурного анализа РЦ из Bl. viridis, доступные к моменту этих исследований [23, 24], позволили сопоставить амплитуды наблюдаемых стадий генерации $\Delta \psi$ с расстояниями между соответствующими редокс-кофакторами. Такое сопоставление показало, что относительный вклад реакций переноса заряда в суммарный электрогенез определяется не только расстояниями между редокс-кофакторами, но и диэлектрическими свойствами соответствующих участков белка [6]. Это наблюдение продемонстрировано на рис. 2, где указаны проекции расстояний между цитохромными гемами c_{556} и c_{559} , c_{559} и P_{960} , P_{960} и Q_A , а также между Q_B и ближайшей границей белок/вода на нормаль к плоскости мембраны, определенные на основании более поздней публикации [28]. Указанные расстояния составляли соответственно 27, 22, 29 и 22% от проекции расстояния между гемом c_{556} и ближайшей границей белок/вода на акцепторном участке белковой глобулы комплекса РЦ. Видно, например, что векторный перенос электрона от Р₉₆₀ к Q_A на участке белка внутри гидрофобной области, соответствующей центральной части мембраны, вносит существенно больший вклад в электрогенез, чем перенос электрона на сходное расстояние между гемами c_{556} и c_{559} , расположенными в области белковой глобулы, выступающей из мембраны в водную фазу.

В заключение отметим, что рассмотренные в данном обзоре работы 1985—1988 гг., выполненные в сотрудничестве с А.А. Константиновым, выявили важные аспекты механизмов электро-



Рис. 2. Схема электрогенных реакций в РЦ из *Bl. viridis.* Справа указаны относительные вклады в суммарный электрогенез (% Δψ) и характерные времена (τ) отдельных реакций переноса электрона; слева – проекции расстояний между редокс-кофакторами на нормаль к плоскости мембраны

генных реакций в фотосинтетических РЦ из пурпурных бактерий R. rubrum, Rba. sphaeroides и Bl. viridis. Многие особенности электрогенеза и реакций электронного транспорта в бактериальных РЦ были описаны впервые. С высоким разрешением исследована кинетика электрогенного переноса электрона между растворимым цит с и комплексом бактериального РЦ. Было показано, что электрогенез, связанный с восстановлением фотоокисленного P_{870} от цит *с* и искусственных редокс-красителей, обусловлен переносом электрона внутри белкового комплекса РЦ, а также выявлен электрогенный характер протонирования дважды восстановленного вторичного хинонного акцептора Q_в. При исследовании РЦ из Bl. viridis были определены спектральные и окислительно-восстановительные характеристики четырех гемов прочносвязанного цит c, измерены скорости восстановления P_{960} и переноса электрона между гемами, а также зарегистрированы стадии электрогенеза, связанные с электрон-транспортными реакциями в этом пигмент-белковом комплексе. Сопоставление

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

относительных вкладов отдельных стадий переноса зарядов в суммарный электрогенез с проекциями расстояний между редокс-кофакторами на нормаль к плоскости мембраны позволило сделать вывод о неоднородности диэлектрической проницаемости внутри белка РЦ.

Александр Константинов сыграл неоценимую роль в выполнении рассмотренных в настоящем обзоре исследований. Он был крупнейшим ученым, настоящим профессионалом, ценил красоту научного эксперимента, обладал блестящей интуицией. Стиль его работы характеризовался широтой научной проблематики, четкостью постановки задач, продуманностью экспериментов, включающей тщательный подбор оптимальных экспериментальных условий. Это делало научные результаты ясными и эффектными. Работать с ним было интересно. При участии А.А. Константинова, часто - при его непосредственном руководстве, были выполнены и защищены кандидатские диссертации И.А. Смирновой, С.М. Драчевой, О.П. Каминской, Д.Л. Заславского, С.А. Силецкого, связанные с использованием прямого электрометрического метода для изучения электрогенеза мембранных белков митохондрий и реакционных центров фотосинтезирующих бактерий.

Коллеги и сотрудники навсегда сохранят светлую память об Александре Константинове.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1985) Electrogenic reduction of *Rhodospirillum rubrum* reaction centre bacteriochlorophyll P870⁺ by redox dyes. Indication of intraprotein electron transfer, *FEBS Lett.*, **189**, 45-49.
- Kaminskaya, O. P., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Electrogenic reduction of the secondary quinone acceptor in chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*. Rapid kinetic measurements, *FEBS Lett.*, 2, 224-228.
- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Kotova, E. A., Mamedov, M. D., et al. (1986) The effect of cytochrome c, hexaammineruthenium and ubiquinone-10 on the kinetics of photoelectric responses of *Rhodospirillum rubrum* reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, 848, 137-146.
- Drachev, L. A., Kaminskaya, O. P., Konstantinov, A. A., Mamedov, M. D., Samuilov, V. D., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Effects of electron donors and acceptors on the kinetics of the photoelectric responses in *Rhodospirillum rubrum* and *Rhodopseudomonas sphaeroides* chromatophores, *Biochim. Biophys. Acta*, 850, 1-9.
- Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Zaberezhnaya, S. M., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., and Skulachev, V. P. (1986) Spectral, redox and kinetic characteristics of highpotential cytochrome c hemes in *Rhodopseudomonas viridis* reaction centers, *FEBS Lett.*, **205**, 41-46.
- reaction centers, FEBS Lett., 205, 41-46.
 Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Yu., Skulachev, V. P., et al. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalysed by photosynthetic reaction centre complex from *Rhodopseudomonas viridis*, Eur. J. Biochem., 171, 253-264.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324.
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Liberman, E. A., Ostroumov, S. A., et al. (1976) Reconstitution of biological molecular generators of electric current. Bacteriorhodopsin, *J. Biol. Chem.*, **251**, 7059-7065.
 Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Kondrashin,
- Drachev, L. A., Frolov, V. N., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Samuilov, V. D., et al. (1976) Generation of electric current by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum* and reconstitution of electrogenic function in subchromatophore pigment-protein complexes, *Biochim. Biophys. Acta*, 440, 637-660.
- Smirnova, I. A., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (1981) Role of cofactors in the formation of the membrane potential by chromatophores of *Rhodospirillum rubrum*, incorporated into a Teflon filter, *Biochemistry (Moscow)*, 46, 925-934.
- Drachev, L. A., Dracheva, S. M., Samuilov, V. D., Semenov, A. Yu, and Skulachev, V. P. (1984) Photoelectric effects in bacterial chromatophores. Comparision of spectral and direct electrometric methods, *Biochim. Biophys. Acta*, 767, 257-262.
- 12. Драчев Л. А., Семенов А. Ю., Скулачев В. П. (1979) Генерация разности электрических потенциалов хрома-

тофорами, индуцируемая лазерной вспышкой, Доклады АН СССР, **245**, 991-994.

- Drachev, L. A., Semenov, A. Yu, Skulachev, V. P., Smirnova, I. A., Chamorovsky, S. K., et al. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes, *Eur. J. Biochem*, 117, 483-489.
- Семенов А. Ю., Чаморовский С. К., Смирнова И. А., Драчев Л. А., Кононенко А. А., Успенская Н. Я., Рубин А. Б., Скулачев В. П. (1981) Кинетика образования фотоиндуцируемой разности электрических потенциалов хроматофорами фотосинтезирующих бактерий, Молекулярная биология, 15, 622-635.
- 15. Chamorovsky, S. K., Drachev, A. L., Karagulian, A. K., Kononenko, A. A., Rubin, A. B., et al. (1985) Fast phases of the generation of the transmembrane electric potential in chromatophores of the photosynthetic bacterium *Ectothiorhodospira shaposhnikovii, Biochim. Biophys. Acta*, **808**, 201-208.
- Packham, N. K., Dutton, P. L., and Mueller, P. (1982) Photoelectric currents across planar bilayer membranes containing bacterial reaction centers. Response under conditions of single electron turnover, *Biophys. J.*, 37, 465-473.
- Drachev, L. A., Mamedov, M. D., Mulkidjanian, A. Ya., Semenov, A. Yu., Shinkarev, V. P., and Verkhovsky, M. I. (1990) Electrogenesis associated with proton transfer in the reaction center protein of the purple bacterium, *FEBS Lett.*, 259, 324-326.
- Wraight, C. A. (1979) Electron acceptors of bacterial photosynthetic reaction centers II. H⁺ binding coupled to secondary electron transfer in the quinone acceptor complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 548, 309-327.
- Vermeglio, A. (1982) Electron transfer between primary and secondary electron acceptors in chromatophores and reaction centers of photosynthetic bacteria, in: *Function of quinones in energy conserving systems* (Trumpower, B. L., ed.), Academic Press, New York, pp. 169-180.
- Petty, K. M., and Dutton, P. L. (1976) Properties of the flash-induced proton binding encountered in membranes of *Rhodopseudomonas sphaeroides:* a functional pK on the ubisemiquinone? *Arch. Biochem. Biophys.*, **172**, 335-345.
 Sebban, P., Maroti, P., and Hanson, D. K. (1995) Electron
- Sebban, P., Maroti, P., and Hanson, D. K. (1995) Electron and proton transfer to the quinones in bacterial photosynthetic reaction centers: insight from combined approaches of molecular genetics and biophysics, *Biochimie*, 77, 677-694.
- 22. Okamura, M. Y., Paddock, M. L., Graige, M. S., and Feher, G. (2000) Proton and electron transfer in bacterial reaction centers, *Biochim. Biophys. Acta*, **1458**, 148-163.
- Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1984) X-ray structure analysis of a membrane protein complex: electron density map at 3 Å resolution and a model of the chromophores of the photosynthetic reaction center from *Rhodopseudomonas viridis*, *J Mol. Biol.*, **180**, 385-398.
- 24. Deisenhofer, J., Epp, O., Miki, K., Huber, R., and Michel, H. (1985) Structure of the protein subunits in the

photosynthetic reaction centre of *Rhodopseudomonas* viridis at 3 Å resolution, *Nature*, **318**, 618-624.

- Clayton, R. K., and Clayton, B. J. (1978) Molar extinction coefficients and other properties of an improved reaction center preparation from *Rhodopseudomonas viridis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **501**, 478-487.
 Case, G. D., Parson, W. W., and Thornber, J. P. (1970)
- Case, G. D., Parson, W. W., and Thornber, J. P. (1970) Photooxidation of cytochromes in reaction center preparations from *Chromatium* and *Rhodopseudomonas viridis*, *Biochim. Biophys. Acta*, 223, 122-128.
- 27. Weyer, K. A., Lottspeich, F., Gruenenberg, H., Lang, F., Oesterhelt, D., and Michel, H. (1987) Amino acid sequence of the cytochrome subunit of the photosynthetic reaction centre from the purple bacterium *Rhodopseudomonas viridis*, *EMBO J.*, **6**, 2197-2202.
- 28. Deisenhofer, J., Epp, O., Sinning, I., and Michel, H. (1995) Crystallographic refinement at 2.3 Å resolution and refined model of the photosynthetic reaction centre from *Rhodopseudomonas viridis*, *J. Mol. Biol.*, **246**, 429-457.

THE MECHANISMS OF ELECTROGENIC REACTIONS IN BACTERIAL PHOTOSYNTHETIC REACTION CENTERS: STUDIES IN COLLABORATION WITH ALEXANDER KONSTANTINOV

Mini-review

O. P. Kaminskaya¹ and A. Yu. Semenov^{2,3*}

 ¹ Institute of Basic Biological Problems, Pushchino Scientific Center for Biological Research, Russian Academy of Sciences, 142290 Pushchino, Moscow Region
 ² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,

119992 Moscow, Russia; E-mail: semenov@belozersky.msu.ru

³ Semenov Federal Research Center for Chemical Physics Russian Academy of Sciences, 119991 Moscow, Russia

In this review, we discuss our studies conducted in 1985-1988 in collaboration with A. A. Konstantinov, one of the top scientists in the field of membrane bioenergetics. Studying fast kinetics of membrane potential generation in photosynthetic reaction centers (RCs) of purple bacteria in response to a laser flash has made it possible to examine in detail the mechanisms of electrogenic reactions at the donor and acceptor sites of RCs. Electrogenesis associated with the intraprotein electron transfer from the exogenous secondary donors, redox dyes, and soluble cytochrome (cyt) *c* to the photooxidized dimer of bacteriochlorophyll P_{870} was studied using proteoliposomes containing RCs from the non-sulfur purple bacterium *Rhodospirillum rubrum*. It was found that reduction of the secondary quinone electron acceptor Q_B accompanied by its protonation in the chromatophores from *R. rubrum* in response to every second light flash was electrogenic. Spectral characteristics and redox potentials of the four hemes in the tightly bound cyt *c* in the RC of *Blastochloris viridis* and electrogenic reactions associated with the electron transfer within the RC complex were identified. For the first time, relative amplitudes of the membrane potential generated in the course of individual electrogenic reactions were compared with the distances between the redox cofactors determined based on the three-dimensional structure of the *Bl. viridis* RC.

Keywords: bacterial photosynthetic reaction centers, electron transfer, direct electrometric method, membrane potential, cytochrome *c*, quinone

УДК 577.121.7

МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ЦИТОХРОМОВ Bacillus subtilis НА 2020 ГОД

Обзор

© 2021 Л. Хедерштедт

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

> Поступила в редакцию 09.09.2020 После доработки 01.11.2020 Принята к публикации 01.11.2020

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

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

DOI: 10.31857/S0320972521010024

введение

Bacillus subtilis, Escherichia coli и Saccharomyces cerevisiae (пекарские дрожжи) являются экспериментально наиболее детально изученными микроорганизмами. Эти организмы и их клеточные компоненты служат моделями для обсуждения и понимания физиологии клетки других микробов на молекулярном уровне и даже, в перспективе, у макроорганизмов. В. subtilis — это преимущественно аэробный организм, в отличие от E. coli и дрожжей, хотя он также может дышать, используя нитраты. На основе недавних открытий как в случае лабораторного штамма 168, так и неодомашненного штамма NCIB 3610 возникает вопрос, может ли *B. subtilis* вообще расти в условиях строгой аноксии [1]. Особенностью видов Bacillus среди бактерий является то, что отдельные клетки могут превратиться в эндоспору, которая является спящей живой клеткой, чрезвычайно устойчивой к теплу, химическим веществам и высыханию и способной выживать в течение чрезвычайно длительных периодов времени [2].

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

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЦЕПЬ АЭРОБНЫХ КЛЕТОК Bacillus subtilis

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

Принятые сокращения: HQNO – n-2-гептил-4-гидроксихинолин оксид; NSMP – питательная среда с фосфатом для спорообразования; TBAB – триптозный кровяной агар; ТМ – трансмембранный α-спиральный сегмент; ТМРD – N,N,N',N'-тетраметил-п-фенилендиамин; SQR – сукцинат:менахинон-оксидоредуктаза; HCOs – гем-медные оксидоредуктазы.

Таблица 1. Гемовые белки B. subtilis 168

Гемовый белок	Функция	Содержание гема	Структурные гены			
Дыхательные цитохромы						
Цитохром аа ₃	менахинол-оксидаза	2 гема А	qoxABCD			
Цитохром саа ₃	цитохром с-оксидаза	2 гема А	ctaCDEF			
		1 гем С				
Цитохром <i>bd</i> ^a	менахинол-оксидаза	2 гема В	cydAB			
		1 гем D				
Цитохром bc-комплекс	менахинол:цитохром с-оксидоредуктаза	2 гема В	qcrABC			
		2 гема С				
SQR (комплекс II)	сукцинат:менахинон-оксидоредуктаза	2 гема В	sdhCAB			
Цитохром <i>с</i> -550	перенос электрона	1 гем С	cccA			
Цитохром с-551	перенос электрона	1 гем С	cccB			
Нитрат редуктаза	менахинол:нитрат-оксидоредуктаза	2 гема В	narGHI			
	Цитохромы Р-450					
BioI	гидроксилаза жирных кислот, участвующая в синтезе биотина	1 гем В	bioI			
CYP107J1	неизвестно	1 гем В	сурА			
CYP134A1	синтез хелатора железа пулчерримина	1 гем В	сурХ			
CYP109B1	монооксигеназа	1 гем В	yji B			
CYP152A1	гидроксилирует миристиновую кислоту в присутствии ${ m H_2O_2}$	1 гем В	cypC			
CYP102A2	гидроксилаза жирной кислоты	1 гем В	yetO			
CYP102A3	гидроксилаза жирной кислоты	1 гем В	yrhJ			
CP107K1	поликетидгидроксилаза	1 гем В	pksS			
Глобины						
Флавогемоглобин	предполагаемая NO диоксигеназа	1 гем В	Нтр			
Усечённый гемоглобин	защита от NO, тиоловый редокс-гомеостаз	1 гем В	yjbI			
ГемАТ	аэротактический преобразователь	1 гем В	hemAT			
Каталазы						
Каталаза I	каталаза вегетативной клетки	1 гем В	katA			
Каталаза II	стресс-индуцированная каталаза	1 гем D	<i>katE</i>			
KatX	связанная с эндоспорой каталаза	1 гем В	<i>katX</i>			
Другие гемовые белки						
ГемА синтаза	синтез гема А из гема О	1 гем В ^ь	ctaA			
NO синтаза	синтез NO из L-аргинина	1 гем В	yflM			

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

церол-3-фосфатдегидрогеназу. Дыхательная система окисления менахинола в аэробных клетках разветвлена несколькими терминальными оксидазами, восстанавливающими молекулярный кислород до воды. Система включает ветвь цитохром с-оксидазы с менахинол-оксидазой цитохрома bc в качестве донора электронов для цитохрома саа3. Небольшие цитохромы с, с-550 или *с*-551, могут облегчать перенос электронов между цитохром *с*-доменом комплекса *bc* и цитохром *с*-доменом комплекса сааз. Цитохром ааз и цитохром bd представляют собой терминальные оксидазы менахинола в дыхательной цепи. Обе цитохром а-содержащие оксидазы являются гем-мед-

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

Активные цитохром *aa*₃ или цитохром *bd* являются необходимым условием для аэробного роста клеток B. subtilis [8]. Цитохром aa₃ является преобладающей оксидазой в различных условиях роста [8, 9], а недостаток этой оксидазы вызывает уменьшение потока метаболитов через цикл Кребса [7]. При низком давлении кислорода или пониженном соотношении NAD/NADH в клетке и у мутантов, дефицитных по цитохрому aa_3 , индуцируется синтез цитохрома bd [10]. Цитохромы типа bd обладают высоким сродством к молекулярному кислороду и менее чувствительны к цианиду и другим соединениям, известным как ингибиторы HCOs [11]. Количество цитохром *с*-оксидазы в *B. subtilis* повышается на ранней стационарной фазе роста и подвержено сильной катаболитной репрессии, например, глюкозой в питательной среде. Мутанты, лишенные как цитохрома *аа*₃, так и *саа*₃, плохо спорулируют, однако соответствующие мутанты, дефектные по одной из оксидаз, продуцируют нормальное количество эндоспор [8]. Важность ветви цитохромов $bc-caa_3$ и цитохромов *с*-550 и *с*-551 для физиологии клеток *В. subtilis* в настоящее время не понята. Цитохром c не важен ни для роста, ни для спорообразования, как показано при использовании мутантов с множественными делециями всех генов цитохрома с (qcrC, ctaC, cccA и cccB) [12], а также дефектных по генам resABC, необходимым для синтеза цитохрома с [13, 14]. Как представлено далее в этом обзоре, отсутствие фенотипического проявления у мутантов, дефектных в ветви цитохром с-оксидазы дыхательной системы, не связано с каким-то нераспознанным дефектом лабораторного штамма 168 B. subtilis, поскольку неодомашненный штамм NCIB 3610, образующий биопленку, обнаруживает ту же особенность.

ЦИТОХРОМ аа₃

Недавно с помощью рентгеноструктурного анализа была получена структура цитохрома *aa*₃

из *B. subtilis* с разрешением 3.6 Å [15]. Подтвердились предсказанные структурные особенности оксидазы, и появилась информация о сайтах связывания менахинона-7. Фермент состоит из четырех полипептидов: субъединица I (QoxB состоит из 649 а.о. и 15-ти трансмембранных αспиральных сегментов (TM)), субъединица II (QoxA после обработки лидерной пептидазой II представляет собой липопротеин из 295 а.о. и 2-х ТМ), субъединица III (QoxC состоит из 204 а.о. и 5-ти ТМ) и субъединица IV (QoxD состоит из 124 а.о. и 3-х ТМ). Субъединица I содержит две молекулы гема А, гем а с низким спином и гем a_3 с высоким спином, а также один атом меди Си_в (табл. 2). Гем а₃-Си_в является частью каталитического центра, где кислород восстанавливается до воды за счет электронов, переносимых при посредстве гема а из сайта окисления менахинола. Самый *N*-концевой ТМ субъединицы I, обозначенный ТМ0, уникален для менахинол-оксидаз по сравнению с цитохром с-оксидазами. Субъединица I имеет два дополнительных ТМ (ТМ13 и ТМ14) на С-конце, а субъединица III не имеет двух ТМ, по сравнению с соответствующими субъединицами классических цитохром с-оксидаз, таких как в митохондриях млекопитающих. ТМ13 и ТМ14 субъединицы I соответствуют первым двум ТМ субъединицы III в классических цитохром с-оксидазах, т.е. последовательности этих двух ТМ в ходе эволюции, повидимому, мигрировали из субъединицы III в субъединицу І. Это событие отражает тот факт, что у большинства дышащих бактерий ген субъединицы III в хромосоме непосредственно следует за геном субъединицы І. Части ТМО, TM1, TM2 и TM3 субъединицы I образуют полость, открытую для липидного бислоя и способную вмещать менахинон. Было показано, что аминокислотные остатки ТМ1 и ТМ2 взаимодействуют с семименахиноном и ингибитором *n*-2-гептил-4-гидроксихинолоноксидом (HQNO), который является миметиком семихинона. Низкие микромолярные концентрации HQNO подавляют менахинол-оксидазную активность цитохрома $aa_3 B.$ subtilis [15].

ВЕТВЬ ЦИТОХРОМ с-ОКСИДАЗЫ

Цитохром *bc* и цитохром *caa*₃ в *B. subtilis* образуют суперкомплекс, который может катализировать окисление менахинола и восстановление кислорода [16–18]. Этот комплекс, по-видимому, включает также цитохром *c*-550 или цитохром *c*-551, как было определено с помощью двумерного электрофореза солюбилизирован-

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

Комплекс цитохрома bc различных видов Bacillus и актинобактерий имеет общие черты с цитохромом $b_6 f$ хлоропластов и цианобактерий, а не с классическим комплексом bc_1 (комплекс III) митохондрий и многих аэробных грамотрицательных бактерий [22]. Белок QcrA B. subtilis (167 a.o. и 1 ТМ) несет 2Fe2S железосерный кластер Rieske-типа. QcrB (224 a.o. и 4 TM) содержит две группы гексакоординированного низкоспинового гема В, гем $b_{\rm H}$ (также называемый b_N или b_D) и b_L (b_P), а также третий гем – c_i (или c_n , или x), который ковалентно связан тиоэфирной связью с одиночным цистеиновым остатком (Cys43 в B. subtilis) [23]. Этот Cys сохранён в цитохроме $b_6 f$ хлоропластов и цианобактерий [23].

Гемы $b_{\rm H}$ и $b_{\rm L}$ связаны, как в классических комплексах bc_1 , с четырьмя аксиальными лигандами His на двух параллельных ТМ, чтобы обеспечивать трансмембранный перенос электронов. В отличие от канонического комплекса III и в соответствии с комплексами $b_6 f$, в *bc*-комплексе B. subtilis C-концевые TM субъединицы, содержащие гем В, по всей видимости, мигрировали на N-конец QcrC. Гем c_i в QcrB расположен рядом с гемом $b_{\rm H}$ и сайтом восстановления менахинона близко к цитоплазматической стороне мембраны. Функция гема *c*_i, который является высокоспиновым и имеет относительно высокий окислительно-восстановительный (редокс) потенциал, остается загадкой. Можно предположить, что пара $b_{\rm H}$ -гем $-c_{\rm i}$ -гем образует альтернативный сайт связывания хинона в каче-

стве адаптации для восстановления менахинона в кислородных условиях, или что гем c_i участвует в циклическом переносе электрона [24]. Образование ковалентной связи гема c_i с полипептидом QcrB B. subtilis происходит независимо от ResABC цитохром с-синтезирующих белков [13], а для комплекса $b_6 f$, как известно, требуется специальный механизм, называемый системой IV, который отсутствует в *B. subtilis* [25]. QcrC (255 a.o. и 3 TM) на С-конце несет домен цитохрома с, расположенный на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Этот цитохром с (с-553) имеет типичное аксиальное лигирование гемового железа с Met и His, но его аминокислотная последовательность отличаетдругих доменов цитохрома СЯ ОТ С в В. subtilis (СссА, СссВ и СtаС) и от цитохрома c_1 митохондрий.

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

Цитохром *c*-553 *bc*-комплекса предположительно достаточен для прямого переноса электронов на цитохром с-551 в комплексе цитохрома саа₃, но, как обсуждается далее в данном обзоре, цитохромы с-550 и с-551 могут опосредовать перенос электрона между двумя ферментами или взаимодействовать с другими компонентами клетки. Комплекс цитохрома *саа*₃ состоит из четырех субъединиц: CtaD (субъединица I, 622 a.o.), СtaC (субъединица II, липопротеин из 336 a.o.), СtaE (субъединица III, 207 a.o.) и СtaF (субъединица IV, 110 а.о.). Субъединица I содержит гем *а* и двуядерный центр гем *а*₃-Си_в. Субъединица II имеет в С-концевой части на внешней стороне мембраны домен с двумя атомами меди в центре Cu_A , за которым следует домен цитохрома c-551. Структура цитохрома caa_3 , вероятно, очень похожа на структуру цитохрома *аа*₃ *M. smegmatis* [19, 20]. Гены оксидазы в хромосоме образуют кластер *ctaABCDEFG*, где ctaA (кодирующий гем А-синтазу) транскрибируется с другой цепи ДНК. Ген ctaG кодирует цитохром саа₃-специфичный фактор биосинтеза, по-видимому, необходимый для включения Cu_в в CtaD [26]. Множество дополнительных белков, кодируемых генами в других частях хромосомы, участвуют в биогенезе цитохрома *caa*₃: Lgt и LspA необходимы для модификации липопротеинов CtaC (и других белков, таких как субъединица II цитохрома *аа*₃), белки ResABC и CcdA необходимы для синтеза цитохрома с [27], СtaA и СtaB – для синтеза гема А [28], Sco (YpmQ) [29] и СtaК [30] – для сборки CuA, CtaM важен для синтеза как цитохрома саа₃, так и аа₃ [30]. Факторы биогенеза цитохрома саа₃ в значительной степени были идентифицированы посредством скрининга мутантов, дефицитных по окислению N,N,N',N'тетраметил-п-фенилендиамина (ТМРD). В клетках B. subtilis эта активность строго зависит от активности цитохрома саа₃ [31]. Гем А в цитохроме *caa*₃ *Bacillus* PS3 и в цитохроме aa_3 Bacillus cereus может быть заменен гемом O [32, 33]. Неизвестно, может ли цитохром *aa*₃ или *caa*₃ B. subtilis включать гем О. Мутанты с заблокированным синтезом гема А (из-за отсутствия CtaA или из-за мутаций в этом белке) содержат гем О, но плохо растут, что указывает на дефектный цитохром *aa*₃, и имеют фенотип, не способный окислять TMPD, что указывает на дефектный цитохром саа₃ [34, 35].

ЦИТОХРОМЫ с-550 и с-551

Все цитохромы *с В. subtilis* прочно связаны с мембраной. Цитохромы с-550 (СссА, 120 а.о.) и с-551 (СссВ, липопротеин из 92 а.о.) имеют очень похожие домены цитохрома, но по-разному прикрепляются к внешней стороне цитоплазматической мембраны. СссА прикреплён с помощью одиночного ТМ, соответствующего нерасщепленной экспортной сигнальной последовательности белка [36, 37]. Липопротеин СссВ удерживается в мембране диацилглицериновым фрагментом, присоединенным к Nконцевому остатку Cys, таким образом, созревание c-551 зависит от Lgt и LspA [38]. В близком ортологе, цитохроме с-551 Bacillus PS3, N-концевой Cys заблокирован, предположительно ацетилирован, и две ацильные цепи представляют собой молекулы пальмитоила [39]. Последовательности доменов цитохрома c, CccA и CccB, подобны последовательности домена цитохрома c CtaC, но отличаются от последовательности QcrC и митохондриального цитохрома c [22, 36, 40]. Структура гомологичного домена цитохрома с Bacillus pasteruii при высоком (0,97 Å) разрешении показана в работе Benini et al. [41]. Гены, кодирующие СссА [36] и СссВ [38] в хромосоме *B. subtilis*, не связаны с генами с известной функцией в дыхательной системе. Экспрессия гена *сссА* подавляется катаболитом [42]. Матричная РНК *сссА* является моноцистронной и имеет длительный период полураспада (15 мин) в клетке по сравнению с периодом полураспада для *сссВ* (7 мин) и средним периодом полураспада (4 мин) для мРНК в *B. subtilis* [43].

Физиологическую роль (роли) двух малых цитохромов с еще предстоит установить. Обнаружено, что СссА и СссВ связаны с суперкомплексом цитохром bc-цитохром caa₃ и, предположительно, способствуют переносу электронов в этом комплексе. Однако нельзя исключить, что малые цитохромы с опосредуют перенос электронов к или от другого компонента(ов) на внешней стороне цитоплазматической мембраны. Не был обнаружен фенотип с недостатком или избытком цитохромов с-550 или с-551 у *B. subtilis.* Однако у *Bacillus anthracis*, который эволюционно близок к B. subtilis [44], экспрессия гена вирулентности нарушается, если отсутствуют как *с*-550 (СссА), так и *с*-551 (СссВ) [45]. Этот эффект наблюдается также у мутантов с блокированным синтезом цитохрома с и у мутантов, лишенных белка BAS3568 (ортолог YozB у B. subtilis), но не у мутантов, дефицитных по цитохромам bc или caa3 или только по одному из малых цитохромов с [45]. Эти данные свидетельствуют о том, что функции с-550 и с-551 перекрываются в некоторых процессах, не зависящих от цитохром с-оксидазной ветви дыхательной системы. Механизм связи между экспрессией генов и наличием двух малых цитохромов с остается неизвестным.

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

ЦИТОХРОМ bd

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

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

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

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

тся под ся высоким в клетках культур, выросших в среектроны, де с высокой плотностью клеток (где содержание кислорода низкое из-за высокой дыхательной активности клеток). Цитохром *bb'* наблюдается у мутантов, лишенных как цитохрома *aa*₃, так и SQR, когда клетки выращивают в условиях, приводящих к очень низкому содержанию цитохрома *bd* [57]. Предполагается, что цитохром *bb'* соответствует СуdAB, содержащему кана-

мозаменяемыми.

мом bd с гемом D, замещенным гемом B), или является оксидазой, структурные гены которой еще не идентифицированы [57]. Последняя возможность кажется маловероятной, поскольку гены B. subtilis детально изучены [58]. Что касается предпочтения сайта связывания гемом, то в цитохроме bd G. thermodenitrificans, по сравнению с цитохромом bd-I E. coli, позиции групп гема b-595 и гема d в CydA взаимозаменяемы [50, 59].

SDS-PAGE и путём окрашивания белков. Ци-

тохром bd родственной бактерии Geobacillus

(Bacillus) stearothermophilus K17, вероятно, содер-

жит CydS, на что указывает ген orf1, следующий

сразу за геном cbdB (для CydB), но это не было

обнаружено при исходном биохимическом ана-

лизе выделенного фермента [48]. Мутанты *B. subtilis* с делецией по *cydABCD* могут быть

функционально дополнены генами судАВСД

Enterococcus faecalis [53], что указывает на то, что

цитохром bd этих бактерий не содержит других белков, кроме CydA и CydB, или что дополни-

тельные функционально важные малые субъ-

единицы у B. subtilis и E. faecalis являются взаи-

несколькими белками [10, 54]. Она подавляется, когда в среде роста присутствует нит-

рат [55], а также при связывании Rex, который

определяет соотношение NAD⁺/NADH в клет-

ке [56]. Когда это соотношение уменьшается,

например в результате недостатка кислорода,

индуцируется транскрипция оперона *cyd* и не-

скольких дополнительных генов [10]. Таким образом, содержание цитохрома bd оказывает-

Экспрессия оперона *судАВСD* регулируется

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

СУКЦИНАТ: МЕНАХИНОН-ОКСИДОРЕДУКТАЗА

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

B. subtilis SQR представляет собой гетеротример, состоящий из флавопротеина (SdhA) с ковалентно связанным FAD в соединении с 8α-N(3) Ніѕ железосерного белка (SdhB) с тремя железосерными кластерами (2Fe2S, 3Fe4S, 4Fe4S) и интегрального мембраного цитохрома b-558 (SdhC) с 5 TM (I–V), содержащего две группы гема В (табл. 2). SdhA и SdhB связываются на цитоплазматической стороне мембраны с цитохромом *b*-558. Активный центр дикарбоксилата находится на SdhA, и электроны передаются от FAD через железосерные кластеры к гему цитохрома *b*-558, чтобы в конечном итоге восстановить менахинон. Две гемовые группы в цитохроме b-558, как и в субъединице цитохрома b комплекса bc, являются низкоспиновыми координированными с бис-гистидинами и с плоскостями порфирина, ориентированными примерно перпендикулярно плоскости мембраны и расположенными так, чтобы обеспечить трансмембранный перенос электронов. Однако есть существенные различия между двумя типами дигемных, трансмембранных цитохромов [63]. В SQR B. subtilis четыре аксиальных лиганда His распределены по четырем ТМ [64], тогда как в комплексе bc они включают только два ТМ [61].

В SQR *B. subtilis* проксимальный гем (b_P , вблизи от мембранных периферических субъединиц A и B на цитоплазматической стороне мембраны) и дистальный гем (b_D , вблизи от внешней стороны мембраны) были определены, как гемы с высоким и низким окислительно-восстановительным потенциалом соответственно, с помощью методов сайт-специфических мутаций и спектроскопии [65, 66] (табл. 2). Гем b_P связан с His70 (TM-II) и His155 (TM-IV), тогда как гем b_D связан с His28 (TM-I) и His113 (TM-III). Измеряемый окислительно-восстановительный потенциал гемов, спектры ЭПР и спектр поглощения видимого света незначительно различаются в зависимости от того, определены ли они для связанного с мембраной SQR, для фермента, выделенного с детергентом, или для цитохрома b-558 (SdhC), выделенного с детергентом [67]. Редокс-сопряжение между двумя гемами в SdhC и между гемом $b_{\rm P}$ и железосерными кластерами в SdhB в интактном SQR, а также взаимодействие с менахиноном и другими липидами, в случае мембранного фермента *B. subtilis*, вероятно, отражают наблюдаемые незначительные различия в свойствах. Как показало исследование связывания HQNO, рядом с гемом $b_{\rm D}$ существует сайт связывания менахинона [65, 68]. Основываясь на собранных данных [60], можно предположить, что имидазольная группа His28 (аксиальный лиганд гема $b_{\rm D}$) и одна из пропионатных групп этого гема напрямую взаимодействуют с менахиноном, аналогично ситуации в нитратредуктазе А E. coli [69]. Трансмембранный электрохимический градиент поддерживает термодинамически эндергонический («uphill») перенос электронов в SQR B. subtilis при окислении сукцината (+25 мB) и переносе электронов через гем $b_{\rm P}$ (+65 мВ) на $b_{\rm D}$ (-95 мВ) для восстановления менахинона-7 (-74 мВ) [70]. То же происходит и у других бактерий, зависимых от хинонов с низким потенциалом при зависимом от сукцинатоксидазы дыхании [71-73].

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

	Простетические группы ^а									
Фермент или цитохром	Центры с гемом			Железосерные кластеры		Центры с медью			G	
	Центр	E _m (mV)	EPR сигнал (g _{max})	α-полоса погл. макс. (nm)	Тип	E _m (mV)	Центр	EPR сигнал (g _{max})	Другие	Ссылки
Шитохром аа.	гем а			601			Cu _B	Cu _B		[102, 103,
	гем <i>a</i> ₃									
	гем а		3,00	605			Cu _A	2,178		[102 104
Цитохром саа ₃	гем а ₃						Cu _B			102, 104, 108]
	гем с		3,46	551						
SQR	гем <i>b</i> _P	+65	3,68	558b	[2Fe2S]	S] +80	EAD	165 (7 100)		
	гем <i>b</i> _D	-95	3,42	558b	[3Fe4S] [4Fe4S]	-25 -240			FAD _{cov}	[65, 67, 100]
Цитохром bc-комплекс	гем b _H гем b _L гем c _i гем c	+250		553	[2Fe2S]					[22, 23, 105]
Цитохром с-550	гем с	+178	3,41	550°						[37]
Цитохром с-551	гем с	>+100 ^d		551e						[38]
Цитохром bd	гем b ₅₅₈			563						
	гем b ₅₉₅			597						[51]
	гем d			626						

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

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

ДЫХАТЕЛЬНАЯ НИТРАТРЕДУКТАЗА

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

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

сакоординированными группами гема b, гемами $b_{\rm H}$ и $b_{\rm L}$, которые лигированы между остатками His на TM-II и TM-V, аналогично ситуации в QcrB комплекса цитохрома bc. NarI связывает на цитоплазматической стороне мембраны периферические субъединицы NarG и NarH. NarG несет группу бис-молибдоптерин-гуаниндинуклеотида и один железосерный кластер 4Fe4S, тогда как NarH содержит три кластера 4Fe4S и один кластер 3Fe4S. Водорастворимый белок NarJ является шапероном для сборки простетической группы молибдоптерина в NarG. Сайт окисления менахинола находится близко к внешней стороне мембраны у гема $b_{\rm L}$, и электроны сначала переносятся через мембрану на гем $b_{\rm H}$, затем через железосерные кластеры в NarH и наконец в NarG, где нитрат восстанавливается. Таким образом, благодаря активности NAR возникает трансмембранный электрохимический градиент.

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

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

Одомашнивание изолятов дикого типа *B. subtilis* при переносе их в лабораторные условия и легкость их генетической трансформации привели к преднамеренному и спонтанному мутагенезу, в результате чего появилось несколько штаммов, включая генетически и биохимически подробно исследованный штамм 168 [57, 83]. Дыхательная система B. subtilis исследовалась преимущественно у этого штамма [3, 4]. Как упоминалось ранее в этом обзоре, делеция генов цитохрома *caa*₃ (*ctaCDEF*) [8, 31] или комплекса цитохрома bc (qcrABC) [22] в лабораторном модельном штамме 168 не влияет на способность к росту на различных субстратах, и также не наблюдается явных компенсаторных изменений в дыхательных ферментах. Это отсутствие фенотипа (фенотипической изменчивости) у мутантов интригует, но может быть объяснено некоторым неизвестным нарушением в передаче электронов от менахинола через комплекс цитохрома bc к цитохрому caa₃ в штамме 168. Чтобы определить, является ли дыхательная система в штамме 168 репрезентативной для клеток B. subtilis, я провел сравнительное исследование неодомашненным штаммом subtilis В. С NCIB 3610. По сравнению со штаммом 168 он образует пелликулярные биопленки, большие массы, продуцирует экзополисахаридную капсулу, производит противомикробные препараты содержит плазмиду, кодирующую бо-И лее 100 белков [84]. Штамм 168 не содержит плазмид. Чтобы облегчить конструирование мутантов путем трансформации, я использовал штамм 3A38, который представляет собой NCIB 3610 с заменой Gln12 на Leu в ComI (ингибитор естественной генетической компетентности) [85].

Секвенирование полного генома подтвердило, что штаммы NCIB 3610 и 3А38 различаются только точечной мутацией в гене *comI* [86]. При конструировании мутантных штаммов (WBS1-2 и WBS10) (табл. 3) было обнаружено, что одна менахинол-оксидаза, цитохром aa_3 или цитохром *bd*, необходима для роста NCIB 3610 в кислородных условиях, то есть мутанты с двойной делецией *qoxABCD* су*dABCD* не могут быть получены точно так же, как в случае штамма 168 [8]. Штаммы WBS4, WBS5 и WBS7 лишены способности окислять TMPD, что свидетельствует о том, что эта активность в NCIB 3610 зависит от цитохрома *caa*₃, как и ожидалось, исходя из свойств штамма 168 [31].

Было обнаружено, что ростовые свойства мутантов по цитохромам штамма NCIB 3610 неотличимы от свойств соответствующих мутантов штамма 168. Т.е. условия роста в жидкой среде NSMP [87] или на чашках с триптозным кровяным агар-агаром (TBAB) («Difco Chem Co», США) отрицательно влияли на те мутантные штаммы, у которых отсутствовал цитохром *аа*₃, тогда как те, у которых отсутствовали ферменты ветви цитохрома $bc-caa_3$ или цитохром bd, pocли подобно родительскому штамму. Влияние на рост, вызванное дефицитом цитохрома аа₃, зависит от добавления в питательную среду ≥0,1% (w/v) глюкозы. Штаммы 168, NCIB 3610 и ЗАЗ8 не показали видимых различий в составе и содержании цитохромов, что было продемонстрировано на изолированных мембранах с помощью спектроскопии в видимом свете с получением разностных спектров (восстановленные аскорбатом и дитионитом минус окисленные феррицианидом). Для анализа состава цитохромов в мутантах бактерии выращивали на NSMP с добавлением 1% (w/v) глюкозы, чтобы избежать различий в скорости роста. Спектры NCIB 3610 с делецией *ctaCD*, *qoxABCD*, *cydABCD* и *qcrABC* соответственно и мутантов с двойной делецией (рисунок) были сходны со спектрами соответствующих делеционных мутантов штамма 168. Результаты показывают, что респираторные компоненты лабораторного штамма 168 являются репрезентативными для видов *B. subtilis*.

Суперкомплекс цитохромов *bc*–*caa*₃ связывается с KinB, и было высказано предположение, что KinB каким-то образом может чувствовать прохождение электронов через суперкомплекс и тем самым отслеживать реальное парциальное давление кислорода [88]. В поддержку этого сообщалось, что инактивация генов ци-

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

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

Примечание. Мутантные производные 3А38 были получены путём трансформации, как описано Hoch [107]. Стрелка указывает на происхождение хромосомной ДНК и на трансформированный штамм. Трансформанты отбирали на чашках с агаром ТВАВ с добавлением 1% (*w/v*) глюкозы и соответствующих антибиотиков в следующих концентрациях: хлорамфеникол, 3 мкг/мл; канамицин, 7,5 мкг/мл; тетрациклин, 15 мкг/мл. ^a Bacillus Genetic Stock Center, Ohio, USA.

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

ЧТО ЕЩЕ ПРЕДСТОИТ ВЫЯСНИТЬ О РЕСПИРАТОРНЫХ ЦИТОХРОМАХ Bacillus subtilis?

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

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

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



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

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

Практически не изучен биогенез гем-содержащих респираторных компонентов и не определены связанные с этим факторы сборки. Однако биогенез гема A и цитохрома c B. subtilis изучен достаточно подробно [27, 28]. Путем скрининга трех коллекций мутантов B. subtilis мы недавно обнаружили два новых фактора сборки цитохром с-оксидазы – СtaК и СtaM [30]. Таким образом, стало известно, что для синтеза цитохрома caa_3 B. subtilis требуется двенадцать различных белков. Для некоторых из этих факторов роль в сборке неясна или не понятна на механистическом уровне. Функция АТР-связывающих белков CydC и CydD при сборке активного цитохрома bd не изучена ни у одной бактерии. Что касается биосинтеза SQR, то белок SdhC в мембране, по-видимому, изменяет конформацию при присоединении гема с образованием цитохрома *b*-558, и это изменение позволяет связывать цитоплазматическую субъединицу железосерных белков SdhB и SdhA, содержащую ковалентно связанный FAD. Неизвестно, как гем доставляется в SdhC, и требуются ли определенные факторы сборки для вставки двух групп гема. Когда три Sdh полипептида B. subtilis продуцируются в клетках E. coli, цитохром b-558 образуется в мембране, но SdhA не флавинилируется и остается в цитоплазме, не связываясь с цитохромом b-558 [93-95]. На основании этих фактов в то время было высказано предположение, что либо для посттрансляционной модификации SdhA необходим специфический фактор, отсутствующий в клетках E. coli, либо этот процесс заблокирован [94]. В дальнейшем белки, которые участвуют в флавинилировании полипепида SdhA, были обнаружены у нескольких организмов [96, 97], но не у *B. sub*tilis. Примечательно, что 6-гидрокси-D-никотиноксидаза Arthrobacter oxydans, которая имеет FAD, ковалентно связанный таким же образом, как и в SQR, флавинилируется в B. subtilis [98]. SdhA – это единственный белок с ковалентно связанным FAD в *B. subtilis*, и FAD не требуется для сборки тримера SQR в мембране [99, 100]. Предполагается найти гены, кодирующие фактор(ы) флавинилирования SdhA, путем скрининга мутантов *B. subtilis*, лишенных SQR-активности, на наличие мутаций, расположенных вне кластера *sdhCAB* в хромосоме [101], но о таких мутантах пока не сообщалось.

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Arjes, H. A., Vo, L., Dunn, C. M., Willis, L., DeRosa, C. A., et al. (2020) Biosurfactant-mediated membrane depolarization maintains viability during oxygen depletion in *Bacillus subtilis, Curr. Biol.*, **30**, 1-12, doi: 10.1016/j.cub. 2020.01.073.
- Nicholson, W. N., Munakata, N., Horneck, G., Melosh, H. J., and Setlow, P. (2000) Resistance of *Bacillus* endospores to extreme terrestrial and extraterrestrial environments, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64, 548-572.

- Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1992) Molecular biology of *Bacillus subtilis* cytochromes, *FEMS Microbiol. Lett.*, 100, 91-100.
- Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (2002) Respiratory cytochromes, other heme proteins, and heme biosynthesis, in *Bacillus subtilis and its closest relatives. From genes to cells*. (Sonenshein, A. L., Hoch, J. A., and Losick, R. eds) ASM Press, Washington DC, pp. 63-179.

- Zhu, B., and Stülke, J. (2018) SubtiWiki in 2018: from genes and proteins to functional network annotation of the model organism *Bacillus subtilis*, *Nucleic Acids Res.*, 46, D743-D748, doi: 10.1093/nar/gkx908.
- 6. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases, *J. Bacteriol.*, **176**, 5587-5600.
- Zamboni, N., and Sauer, U. (2003) Knockout of the highcoupling cytochrome *aa*₃ oxidase reduces TCA cycle fluxes in *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **226**, 121-126, doi: 10.1016/S0378-1097(03)00614-1.
- 8. Winstedt, L., and von Wachenfeldt, C. (2000) Terminal oxidases of *Bacillus subtilis* strain 168: one quinol oxidase, cytochrome *aa*₃ or cytochrome *bd*, is required for aerobic growth, *J. Bacteriol.*, **182**, 6557-6564.
- Santana, M., Kunst, F., Hullo, M. F., Rapoport, G., Danchin, A., and Glaser, P. (1992) Molecular cloning, sequencing, and physiological characterization of the *qox* operon from *Bacillus subtilis* encoding the *aa*₃-600 quinol oxidase, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10225-10231.
- Larsson, J. T., Rogstam, A., and von Wachenfeldt, C. (2005) Coordinated patterns of cytochrome bd and lactate dehydrogenase expression in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, 151, 3323-3335.
- Borisov, V., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovsky, M. I. (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 1398-1413.
- Schiott, T., and Hederstedt, L. (2000) Efficient spore synthesis in *Bacillus subtilis* depends on the CcdA protein, *J. Bacteriol.*, **182**, 2845-2854.
 Le Brun, N. E., Bengtsson, J., and Hederstedt, L. (2000)
- Le Brun, N. E., Bengtsson, J., and Hederstedt, L. (2000) Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis, Mol. Microbiol.*, **36**, 638-650.
- Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis, *J. Biol. Chem.*, 278, 17852-17858, doi: 10.1074/jbc.M300103200.
- Xu, J., Ding, Z., Liu, B., Yi, S. M., Li, J., et al. (2019) Structure of the cytochrome *aa*₃-600 heme-copper menaquinol oxidase bound to inhibitor HQNO shows TM0 is part of the quinol binding site, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 117, 872-876.
- Melo, A. P. M., and Teixeira, M. (2016) Supramolecular organizaton of bacterial aerobic respiratory chains: from cells and back, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 190-197.
- Sousa, P. M. F., Videira, M. A. M., Santos, F. A. S., Hood, B. L., Conrads, T. P., and Melo, A. M. P. (2013) The *bc:caa*₃ supercomplexes from the Gram positive bacterium *Bacillus subtilis* respiratory chain: a megacomplex organization? *Arch. Biochem. Biophys.*, 537, 153-160.
- Montes de Oca, L. Y. J. G., Chagolla-Lopez, A., de la Vara, L., Cabellos-Alevar, T., Gomez-Lojero, C., and Gutierrez Cirlos, E. B. (2012) The composition of the *Bacillus subtilis* aerobic respiratory chain supercomplexes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 44, 473-486.
- Gong, H., Li, J., Xu, A., Tang, Y., Ji, W., Gao, R., et al. (2018) An electron transfer path connects subunits of a mycobacterial respiratory supercomplex, *Science*, 362, eaat8923, doi: 10.1126/science.aat8923.
- Wiseman, B., Nitharwal, R. G., Fedotovskaya, O., Schäfer, J., Guo, H., et al. (2018) Structure of a functional obligate complex III₂IV₂ respiratory supercomplex from *Mycobacterium smegmatis*, *Nature Struct. Mol. Biol.*, **25**, 1128-1136, doi: 10.1038/s41594-018-0160-3.
- Montes de Oca, L. Y. J. G., Avelar, T. C., Picón Garrido, G. I., Chagoya-López, A., González de la Vara, L., et al. (2016) Cardiolipin deficiency causes a dissociation of the *b6c:caa*₃ megacomplex in *B. subtilis* membranes, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 48, 451-467.

- 22. Yu, J., Hederstedt, L., and Piggot, P. J. (1995) The cytochrome *bc* complex (menaquinone:cytochrome *c* reductase) in *Bacillus subtilis* has a nontraditional subunit organization, *J. Bacteriol.*, **177**, 6751-6760.
- 23. Yu, J., and Le Brun, N. E. (1998) Studies of the cytochrome subunits of menaquinone:cytochrome *c* reductase (*bc* complex) of *Bacillus subtilis*. Evidence for the covalent attachment of heme to the cytochrome *b* subunit, *J. Biol. Chem.*, **273**, 8860-8866.
- 24. Baniulis, D., Yamashita, E., Zhang, H., Hasan, S. S., and Cramer, WA. (2008) Structure-function of the cytochrome *b*₆*f* complex, *Photochem. Photobiol.*, **84**, 1349-1350.
- 25. De Vitry, C. (2011) Cytochrome *c* maturation system on the negative side of bioenergetic membranes: CCB or system IV, *FEBS J.*, **278**, 4189-4197.
- 26. Bengtsson, J., von Wachenfeldt, C., Winstedt, L., Nygaard, P., and Hederstedt, L. (2004) CtaG is required for formation of active cytochrome c oxidase in *Bacillus subtilis*, *Microbiology*, **150**, 415-425.
- Simon, J., and Hederstedt, L. (2011) Composition and function of cytochrome *c* biogenesis system II, *FEBS J.*, 278, 4179-4188, doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08374.x.
- Hederstedt, L. (2012) Heme A biosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 920-927, doi: 10.1016/j.bbabio.2012. 03.025.
- 29. Mattatall, N. R., Jazairi, J., and Hill, B. C. (2000) Characterization of YpmQ, an accessory protein required for the expression of cytochrome *c* oxidase in *Bacillus subtilis, J. Biol. Chem.*, **275**, 28802-28809.
- tilis, J. Biol. Chem., 275, 28802-28809.
 30. Von Wachenfeldt, C., Hallgren, J., and Hederstedt, L. (2020) Cytochrome c oxidase biosynthesis factors in *Bacillus subtilis*: Discovery of YtkA (CtaK) and YozB (CtaM), in press.
- Van der Oost, J., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Saraste, M. (1991) *Bacillus subtilis* cytochrome oxidase mutants: biochemical analysis and genetic evidence for two *aa*₃-type oxidases, *Mol. Microbiol.*, 5, 2063-2072.
- 32. Contreras-Zentella, M., Mendoza, G., HMembrillo-Hernández, J., and Escamilla, J. E. (2003) A novel double heme substitution produces a functional *bo*₃ variant of the quinol oxidase *aa*₃ of *Bacillus cereus*, *J. Biol. Chem.*, **278**, 31473-31478.
- 33. Sone, N., and Fujiwara, Y. (1991) Haem O can replace haem A in the active site of cytochrome *c* oxidase from thermophilic bacterium PS3, *FEBS Lett.*, **288**, 154-158.
- Svensson, B., Lubben, M., and Hederstedt, L. (1993) Bacillus subtilis CtaA and CtaB function in haem A biosynthesis, Mol. Microbiol., 10, 193-201.
- Hederstedt, L., Lewin, A., and Throne-Holst, M. (2005) Heme A synthase enzyme functions dissected by mutagenesis of *Bacillus subtilis* CtaA, *J. Bacteriol.*, **187**, 8361-8369, doi: 10.1128/JB.187.24.8361-8369.2005.
- Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1990) Bacillus subtilis 13-kilodalton cytochrome c-550 encoded by cccA consists of a membrane-anchor and a heme domain, J. Biol. Chem., 265, 13939-13948.
- 37. Von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1993) Physicochemical characterisation of membrane-bound and watersoluble forms of *Bacillus subtilis* cytochrome *c*-550, *Eur. J. Biochem.*, **212**, 499-509.
- Bengtsson, J., Rivolta, C., Hederstedt, L., and Karamata, D. (1999) *Bacillus subtilis* contains two small *c*-type cytochromes with homologous heme domains but different types of membrane anchors, *J. Biol. Chem.*, 274, 26179-26184.
- Fujiwara, Y., Oka, M., Hamamoto, T., and Sone, N. (1993) Cytochrome c-551 of the thermophilic bacterium PS3, DNA sequence and analysis of the mature cytochrome, *Biochim. Biophys. Acta*, **1144**, 213-218.

- 40. Sone, N., and Toh, H. (1994) Membrane-bound *Bacillus* cytochromes *c* and their phylogenetic position among bacterial class I cytochromes *c*, *FEMS Microbiol. Lett.*, **122**, 203-210.
- Benini, S., Gonzales, A., Rypniewski, W. R., Wilson, K. S., van Beeumen, J. J., and Ciurli, S. (2000) Crystal structure of oxidized *Bacillus pasteurii* cytochrome c553 at 0.97-Å resolution, *Biochemistry*, **39**, 13115-13126, doi: 10.1021/ bi000402j.
- 42. Monedero, V., Boël, G., and Deutscher, J. (2001) Catabolite regulation of the cytochrome *c550*-encoding *Bacillus subtilis cccA* gene, *J. Mol. Biol. Biotech.*, **3**, 433-438.
- Hambraeus, G., von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (2003) Genome-wide survey of mRNA half-lives in *Bacillus subtilis* identifies extremely stable mRNAs, *Mol. Genet. Genomics*, 269, 706-714, doi: 10.1007/s00438-003-0883-6.
- 44. Anderson, I., Sorokin, A. K., Kapatral, V., Reznik, G., Bhattacharya, A., Mikhailova, N., et al. (2005) Comparative genome analysis of *Bacillus cereus* group genomes with *Bacillus subtilis*, *FEMS Microbiol. Lett.*, 250, 175-184, doi: 10.1016/j.femsle.2005.07.008.
- Wilson, A. C., Hoch, J., and Perego, M. (2009) Two small *c*-type cytochromes affect virulence gene expression in *Bacillus anthracis, Mol. Microbiol.*, **72**, 109-123.
 Gustavsson, T., Trane, M., Moparthi, V. K., Miklovyte, E.,
- 46. Gustavsson, T., Trane, M., Moparthi, V. K., Miklovyte, E., Mopharti, L., Gorecki, K., et al. (2010) A cytochrome *c* fusion protein domain for convenient detection, quantification, and enhanced production of membrane proteins in *Escherichia coli*-expression and characterization of cytochrome-tagged complex I subunits, *Protein Sci.*, 19, 1445-1460, doi: 10.1002/pro.424.
- 47. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffé, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microbial. Physiol.*, **71**, 171-234.
- Sakamoto, J., Koga, E., Mizuta, T., Sato, C., Noguchi, S., and Sone, N. (1999) Gene structure and quinol oxidase activity of a cytochrome *bd*-type oxidase from *Bacillus stearothermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1411**, 147-158, doi: 10.1016/s0005-2728(99)00012-2.
- 49. Safarian, S., Rajendran, C., Müller, H., Preu, J., Langer, J. D., et al. (2016) Structure of a *bd* oxidase indicates similar mechanisms for membrane-integrated oxygen reductases, *Science*, **352**, 583-586.
- 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.
- Winstedt, L., Yoshida, K., Fujita, Y., and von Wachenfeldt, C. (1998) Cytochrome bd biosynthesis in Bacillus subtilis: characterization of the cydABCD operon, J. Bacteriol., 180, 6571-6580.
- 52. Kjelgaard, P. (2007) *Studies on Haemproteins of Gram-positive Bacteria*, PhD thesis, Lund University, Lund, Sweden.
- 53. Winstedt, L., Frankenberg, L., Hederstedt, L., and Wachenfeldt, C. V. (2000) *Enterococcus faecalis* V583 contains a cytochrome *bd*-type respiratory oxidase, *J. Bacteriol.*, **182**, 3863-3866.
- Puri-Taneja, A., Schau, M., Chen, Y., and Hulett, F. M. (2007) Regulators of the *Bacillus subtilis cydABCD* operon: identification of a negative regulator, CcpA, and a positive regulator, ResD, *J. Bacteriol.*, **189**, 3348-3358, doi: 10.1128/JB.00050-07.
- 55. Reents, H., Münch, R., Dammeyer, T., Jahn, D., and Härtig, E. (2006) The Fnr regulon of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **188**, 1103-1112.
- Wang, E., Bauer, M., Rogstam, A., Linse, S., Logan, D., and Von Wachenfeldt, C. (2008) Structure and functional

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

properties of the *Bacillus subtilis* transcriptional repressor Rex, *Mol. Microbiol.*, **69**, 466-478.

- Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Konstantinov, A. A. (1999) A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168, J. Biol. Chem., 274, 32810-32817.
- Borriss, R., Danchin, A., Harwood, C. R., Médigue, C., Rocha, E. P. C., Sekowska, A., and Vallenet, D. (2017) *Bacillus subtilis*, the model Gram-positive bacterium: 20 years of annotation refinement, *Microbial biotechnol.*, 11, 3-17.
- Thebeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kägi, J., et al. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Comm.*, 10, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
- 60. Hederstedt, L. (2002) Succinate:quinone oxidoreductase in the bacteria *Paracoccus denitrificans* and *Bacillus subtilis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 74-83.
- 61. Lancaster, C. R. D. (2013) The di-heme family of respiratory complex II enzymes, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 679-687.
- 62. Hederstedt, L., and Ohnishi, T. (1992) Progress in succinate:quinone oxidoreductase research, in *Molecular Mechanisms in Bioenergetics* (Ernster, L., ed.), Elsevier, Amsterdam, pp. 163-198.
- 63. Berry, E. A., and Walker, F. A. (2008) Bis-histidine-coordinated hemes in four-helix bundels: how the geometry of the bundle controls the axial imidazole plane orientations in transmembrane cytochromes of mitochondrial Complexes II and III and related proteions, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **13**, 481-498.
- 64. Hägerhäll, C., and Hederstedt, L. (1996) A structural model for the membrane-integral domain of succinate:quinone oxidoreductases, *FEBS Lett.*, **389**, 25-31.
- 65. Matsson, M., Tolstoy, D., Aasa, R., and Hederstedt, L. (2000) The distal heme center in *Bacillus subtilis* succinate:quinone reductase is crucial for electron transfer to menaquinone, *Biochemistry*, **39**, 8617-8624.
- Hägerhäll, C., Friden, H., Aasa, R., and Hederstedt, L. (1995) Transmembrane topology and axial ligands to hemes in the cytochrome b subunit of *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone reductase, *Biochemistry*, 34, 11080-11089.
- 67. Hägerhäll, C., Aasa, R., von Wachenfeldt, C., and Hederstedt, L. (1992) Two hemes in *Bacillus subtilis* succinate:menaquinone oxidoreductase (complex II), *Biochemistry*, **31**, 7411-7421.
- 68. Smirnova, I. A., Hägerhäll, C., Konstantinov, A. A., and Hederstedt, L. (1995) HOQNO interaction with cytochrome *b* in succinate:menaquinone oxidoreductase from *Bacillus subtilis*, *FEBS Lett.*, **359**, 23-26.
- 69. Fedor, J. G., Rothery, R. A., Giraldi, K. S., and Weiner, J. H. (2014) Q-site occupancy defines heme heterogenity in *Escherichia coli* nitrate reductase A (NarGHI), *Biochemistry*, **53**, 1733-1741.
- Schnorpfeil, M., Janausch, I. G., Biel, S., Kröger, A., and Unden, G. (2001) Generation of a proton potential by succinate dehydrogenase of *Bacillus subtilis* functioning as a fumarate reductase, *Eur. J. Biochem.*, 268, 3069-3074.
- Madej, M. G., Nasiri, H. R., Hilgendorff, N. S., Schwalbe, H., Unden, G., and Lancaster, C. R. D. (2006) Experimental evidence for proton motive force-dependent catalysis by the diheme-containing succinate:menaquinone oxidoreductase from the gram-positive bacterium *Bacillus licheniformis*, *Biochemistry*, 45, 15049-15055.
- Schirawski, J., and Unden, G. (1998) Menaquinonedependent succinate dehydrogenase of bacteria catalyzes reversed electron transport driven by the proton potential, *Eur. J. Biochem.*, 257, 210-215.

- Zaunmüller, T., Kelly, D. J., Glöckner, F. O., and Unden, G. (2006) Succinate dehydrogenase functioning by reverse redox loop mechanism and fumarate reductase in sulphatereducing bacteria, *Microbiology*, **152**, 2443-2453.
 Gong, H., Gao, Y., Zhou, X., Xiao, Y., Wang, W., et al.
- Gong, H., Gao, Y., Zhou, X., Xiao, Y., Wang, W., et al. (2020) Cryo-EM structure of trimeric *Mycobacterium* smegmatis succinate dehydrogenase with a membraneanchor SdhF, *Nat. Comm.*, **11**, 4245, doi: 10.1038/s41467-020-18011-9.
- Lancaster, C. R. D., Kröger, A., Auer, M., and Michel, H. (1999) Structure of fumarate reductase from *Wolinella succinogenes* at 2.2 Å resolution, *Nature*, **402**, 377-385.
- 76. Guan, H.-H., Hsieh, Y.-C., Lin, P.-J., Huang, Y.-C., Yoshimura, M., et al. (2018) Structural insights into the electron/proton transfer pathways in the quinol:fumarate reductase from *Desulfovibrio gigas*, *Sci. Rep.*, 8, 14935, doi: 10.1038/s41598-018-33193-5.
- Wöhri, A. B., Johansson, L. C., Wadsten-Hindrichsen, P., Wahlghren, W. Y., Fisher, G., et al. (2008) A lipidic-sponge phase screen for membrane protein crystallization, *Structure*, 16, 1003-1009, doi: 10.1016/j.str.2008.06.003.
- Baureder, M., and Hederstedt, L. (2011) Production, purification and detergent exchange of isotopically labeled *Bacillus subtilis* cytochrome *b*558 (SdhC), *Protein Expr. Purif.*, **80**, 97-101, doi: 10.1016/j.pep.2011.05.013.
- 79. Hoffman, T., Troup, B., Szabo, A., Hungerer, C., and Jahn, D. (1995) The anaerobic life of *Bacillus subtilis*: cloning of the genes encoding the respiratory nitrate reductase system, *FEMS Microbiol. Lett.*, **131**, 219-225.
- Richardson, D. J., Berks, B. C., Rusell, D. A., Spiro, S., and Taylor, C. J. (2001) Functional, biochemical and genetic diversity of prokaryotic nitrate reductases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 165-178.
- Bertero, M. G., Rothery, R. A., Palak, M., Hou, C., Lim, D., et al. (2003) Insight into the respiratory electron transfer pathway from the structure of nitrate reductase A, *Nat. Struct. Biol.*, **10**, 681-686.
- Blasco, D., Guigliarelli, B., Magalon, A., Asso, M., Giordano, G., and Rothery, R. A. (2001) The coordination and function of the redox centers of membrane-bound nitrate reductases, *Cell. Mol. Life Sci.*, 58, 179-193.
- Zeigler, D. R., Prágai, Z., Rodriguez, S., Chevreux, B., Muffler, A., et al. (2008) The Origins of 168, W23, and other *Bacillus subtilis* legacy strains, *J. Bacteriol.*, **190**, 6983-6995.
- Burton, A. T., and Kearns, D. B. (2020) The large pBS32/pLS32c plasmid of ancestral *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, 202, e00290-20, doi: 10.1128/JB-00290-20.
- Konkol, M. A., Blair, K. M., and Kearns, D. B. (2013) Plasmid-encoded ComI inhibits competence in the ancestral 3610 strain of *Bacillus subtilis*, *J. Bacteriol.*, **195**, 4085-4093.
- Nye, T. M., Schroeder, J. W., Kearns, D. B., and Simmons, L. A. (2017) Complete genome sequence of undomesticated *Bacillus subtilis* strain NCIB 3610, *Genome Announc.*, 5, e00364-e00317, doi: 10.1128/genomeA.00364-17.
- 87. Hederstedt, L. (1986) Molecular properties, genetics, and biosynthesis of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex, *Methods Enzymol.*, **126**, 399-414.
- Kolodkin-Gal, I., Elsholz, A. K. W., Muth, C., Girguis, P. R., Kolter, R., and Losick, R. (2013) Respiration control of multicellularity in *Bacillus subtilis* by a complex of the cytochrome chain with a membrabe-embedded histidine kinase, *Genes Dev.*, 27, 887-899.
- Zhou, X., Zhang, N., Xia, L., Li, Q., Shao, J., Shen, Q., and Zhang, R. (2018) ResDE two-component regulatory system mediates oxygen limitaton-induced biofilm formation by *Bacillus amyloliquefaciens* SQR9, *App. Environ. Microbiol.*, 84, e02744-02717.
- 90. Azarkina, N., and Konstantinov, A. A. (2002) Stimulation of menaquinone-dependent electron transfer in the respi-

ratory chain of *Bacillus subtilis* by membrane erergization, *J. Bacteriol.*, **184**, 5339-5347.

- 91. Tochikubo, K. (1971) Changes in terminal respiratory pathways of *Bacillus subtilis* during germination, outgrowth and vegetative growth, *J. Bacteriol.*, **108**, 652-661.
- Tan, I. S., and Ramamurthi, K. S. (2014) Spore formation in *Bacillus subtilis, Environ. Microbiol. Rep.*, 6, 212-225, doi: 10.1111/1758-2229.12130.
- 93. Magnusson, K., Hederstedt, L., and Rutberg, L. (1985) Cloning and expression in *Escherichia coli* of *sdhA*, the structural gene for cytochrome *b*558 of the *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase complex, *J. Bacteriol.*, **162**, 1180-1185.
- 94. Hederstedt, L., Bergman, T., and Jörnvall, H. (1987) Processing of *Bacillus subtilis* succinate dehydrogenase and cytochrome b-558 polypeptides. Lack of covalently bound flavin in the *Bacillus* enzyme expressed in *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **213**, 385-390.
- 95. Phillips, M. K., Hederstedt, L., Hasnain, S., Rutberg, L., and Guest, J. R. (1987) Nucleotide sequence encoding the flavoprotein and iron-sulfur protein subunits of the *Bacillus subtilis* PY79 succinate dehydrogenase complex, *J. Bacteriol.*, **169**, 864-873.
- Moosavi, B., Berry, E. A., Zhu, X.-L., and Yang, W.-C. (2019) The assembly of succinate dehydrogenase: a key enzyme in bioenergetics, *Cell. Mol. Life Sci.*, 76, 4023-4042.
- 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.
- Brandsch, R., and Hederstedt, L. (1989) Expression and flavinylation of *Arthrobacter oxydans* 6-hydroxy-D-nicotine oxidase in *Bacillus subtilis*, J. Gen. Microbiol., 135, 1093-1099.
- Hederstedt, L. (1983) Succinate dehydrogenase mutants of Bacillus subtilis lacking covalently bound flavin in the flavoprotein subunit, Eur. J. Biochem., 132, 589-593.
- 100. Maguire, J., Magnusson, K., and Hederstedt, L. (1986) *Bacillus subtilis* mutant succinate dehydrogenase lacking covalently bound flavin: identification of the primary defect and studies on the iron-sulfur clusters in mutated and wild type enzyme, *Biochemistry*, **25**, 5202-5208.
- 101. Hederstedt, L., Magnusson, K., and Rutberg, L. (1982) Reconstitution of succinate dehydrogenase in *Bacillus subtilis* by protoplast fusion, *J. Bacteriol.*, **152**, 157-165.
- Lauraeus, M., Haltia, T., Saraste, M., and Wikstrom, M. (1991) *Bacillus subtilis* expresses two kinds of haem A-containing terminal oxidases, *Eur. J. Biochem.*, **197**, 699-705.
- 103. Lauraeus, M., Wikström, M., Varotsis, C., Tecklenburg, M. J., and Babcock, G. T. (1992) Optical and resonance raman spectroscopy of the heme groups of the quinol-oxidizing cytochrome *aa*₃ of *Bacillus subtilis*, *Biochemistry*, **31**, 10054-10060.
- 104. Von Wachenfeldt, C., de Vries, S., and van der Oost, J. (1994) The Cu_A site of the *caa₃*-type oxidase of *Bacillus subtilis* a mixed-valence binuclear copper centre, *FEBS Lett.*, **340**, 109-113.
- 105. De Vrij, W., van der Burg, B., and Konings, W. N. (1987) Spectral and potentiometric analysis of cytochromes from *Bacillus subtilis, Eur. J. Biochem.*, **166**, 589-595.
- 106. Sone, N., Kutoh, E., and Yanagita, Y. (1989) Cytochrome *c*-551 from the thermophilic bacterium PS3 grown under air-limited conditions, *Biochim. Biophys. Acta*, **977**, 329-334.
- 107. Hoch, J. A. (1991) Genetic analysis in *Bacillus subtilis*, *Methods Enzymol.*, **204**, 305-320.
- 108. Henning, W., Vo, L., Albanese, J., and Hill, B. C. (1995) High-yield purification of cytochrome *aa*₃ and cytochrome *caa*₃ oxidases from *Bacillus subtilis* plasma membranes, *Biochem. J.*, **309**, 279-283.

Review

L. Hederstedt

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

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

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

УДК 577.151.63

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

Обзор

© 2021 В.Б. Борисов^{1*}, Е. Форте²

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: bor@belozersky.msu.ru ² Римский университет Ла Сапиенца, Отдел биохимических наук, I-00185 Рим, Италия

> Поступила в редакцию 15.09.2020 После доработки 15.09.2020 Принята к публикации 26.10.2020

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

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: дыхательная цепь, терминальная оксидаза, гем-медная оксидаза, цитохром *bd*, гем. **DOI:** 10.31857/S0320972521010036

СЕРОВОДОРОД: СВОЙСТВА, ОБРАЗОВАНИЕ И ФИЗИОЛОГИЧЕСКОЕ ЗНАЧЕНИЕ

 H_2S — бесцветный, ядовитый, легковоспламеняющийся и едкий газ, пахнущий тухлыми яйцами. Он способен свободно диффундировать через мембраны [1]. Вслед за окисью азота (NO) и окисью углерода (CO), H_2S считается третьим «газотрансмиттером» или эндогенной газообразной сигнальной молекулой [2]. Это соединение играет важную роль в организмах различных таксономических групп — от бактерий до растений, животных и людей. Будучи слабой кислотой, H_2S в водном растворе находится в равновесии со своими анионами — гидросульфидом (HS⁻) и сульфидом (S²⁻), в соответствии с уравнением, приведенным на рис. 1. Используя значение pK_{a1} при 25 °С, которое в экспериментальных статьях варьируется в пределах 6,97–7,06 [3], можно рассчитать, что при физиологическом pH 7,4 69–73% общего пула сульфидов в растворе существует как HS⁻, а 27–31% присутствует в форме H₂S. Большая величина pK_{a2} (12,2–19) предполагает, что количество S²⁻ в растворе пренебрежимо мало. В литературе «H₂S» часто используется для обозначения общего пула сульфидов (H₂S + HS⁻ + S²⁻), если не указано иное.

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

Принятые сокращения: DTT – дитиотреитол; 3-MST – 3-меркаптопируват-серотрансфераза; CBS – цистатионин- β -синтаза; CSE – цистатионин- γ -лиаза; *EhOASS – О*-ацетилсерин сульфгидрилаза из *Entamoeba histolytica*; OAS – *O*-ацетил-L-серин; OASS – *O*-ацетилсерин сульфгидрилаза; $Q_1 - 2,3$ -диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохинон.

^{*} Адресат для корреспонденции.



 $pK_{a1} = 6,97-7,06$

 $pK_{a2} = 12,2-19$

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

фосфатом и свободным или связанным с гемом железом [6]. Ферментативная генерация H₂S у млекопитающих в основном обеспечивается цистатионин-β-синтазой (CBS), цистатионину-лиазой (CSE) и 3-меркаптопируват-серотрансферазой (3-MST) [4, 5, 7]. CBS и CSE являются важными ферментами в пути транссульфурации, и оба используют пиридоксальфосфат в качестве кофактора. Каноническая реакция β-замещения, катализируемая CBS, представляет собой конденсацию гомоцистеина и серина с образованием цистатионина и воды. Однако в присутствии цистеина CBS может катализировать конденсацию гомоцистеина и цистеина с образованием цистатионина и H₂S. CSE обычно катализирует превращение цистатионина в цистеин и α-кетобутират. Вдобавок этот фермент способен генерировать H₂S посредством реакции α -, β -элиминирования с цистеином либо реакции у-замещения между двумя молекулами гомоцистеина. 3-MST образует H₂S из 3-меркаптопирувата во взаимодействии с цистеинаминотрансферазой или оксидазой D-аминокислот. Последние два фермента синтезируют 3меркаптопируват с использованием цистеина в качестве субстрата [7, 8]. CBS обнаруживает высокий уровень экспрессии в астроцитах головного мозга, репродуктивных органах, поджелудочной железе. CSE в основном присутствует в печени, гладких мышцах, макрофагах, нейронах и почках. 3-MST преимущественно экспрессируется в кишечнике, почках, клетках сердечной мышцы, печени и нейронах [4].

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

ной модификации остатков цистеина белка с образованием персульфидов белка [9]. Первичной мишенью передачи сигналов посредством H₂S являются митохондрии. В клетках млекопитающих H₂S проявляет двухфазный, зависимый от концентрации способ действия. При низких концентрациях H₂S обладает цитопротекторным действием, тогда как при более высоких концентрациях он цитотоксичен. В митохондриях H_2S в наномолярных концентрациях действует как цитопротектор: он поддерживает энергетический метаболизм, являясь субстратом для дыхательной цепи, предотвращает апоптоз, увеличивает митохондриальный биогенез [4]. В более высоких концентрациях H₂S подавляет дыхательную цепь за счет прямого связывания с цитохром с-оксидазой и ее ингибирования [10]. Это приводит к диссипации трансмембранного потенциала митохондрий, ингибированию аэробного синтеза АТФ и усилению производства активных форм кислорода [11]. В токсичных концентрациях H₂S также вызывает апоптоз клеток через канонический путь каспазного каскада [4].

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

Бактерии обладают ортологами ферментов млекопитающих CBS, CSE и 3-MST для продукции H_2S . Кроме того, сульфатредуцирующие бактерии (SRB) образуют H₂S, задействуя путь так называемого диссимиляционного восстановления сульфата. В этом метаболическом пути анаэробного дыхания сульфат используется как конечный акцептор электронов с образованием H_2S в качестве основного конечного продукта [13]. У бактерий физиологические функции H_2S еще предстоит установить. Тем не менее сообщалось, что по крайней мере у Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa, Staphylococcus aureus и Bacillus anthracis обладание способностью генерировать Н₂S повышает устойчивость к антибиотикам за счет смягчения окислительного стресса, вызванного антибиотиками [14]. Эти данные свидетельствуют о том, что цитопротекторное действие H₂S является универсальным защитным механизмом для всех форм жизни от бактерий до людей [15].

В большинстве тканей млекопитающих стационарные внутриклеточные концентрации H₂S находятся в низком наномолярном диапазоне. Например, концентрация H₂S, измеренная в тканях печени и мозга мышей, оказалась равна ~15 нМ [16]. Уровень H₂S в желудочнокишечном тракте намного выше, чем в любом другом отделе тела млекопитающего. Кишечник млекопитающих заселяется бактериями на самых ранних этапах жизни. В толстой кишке «среднестатистического» мужчины весом 70 кг содержится 3.8×10^{13} бактерий [17]. Они представлены 2172 различными видами 12 различных типов [18]. В отличие от других отделов тела, в кишечнике H₂S продуцируется не только CBS, CSE и 3-MST хозяина, но и в метаболизме аминокислот резидентной микробиоты кишечника, а также путем диссимиляционного восстановления сульфатов SRB [13]. Поэтому неудивительно, что уровень Н₂S в кишечнике чрезвычайно высок. Например, у взрослых мышей средние концентрации H₂S составляют 1, 0,2 и 0,4 мМ в слепой кишке, проксимальном и дистальном отделах толстой кишки соответственно [19]. В кале человека эти значения находятся в диапазоне 0,3-3,4 мМ [20]. Сообщалось, что концентрация свободного газа H₂S в просвете кишечника у крыс и людей составляет 40-60 мкМ [21-23].

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



Рис. 2. Схема аэробной дыхательной цепи *Escherichia coli*. Две NADH:хинон оксидоредуктазы (NDH-I и NDH-II) переносят электроны от NADH на убихинон-8 (Q). Затем три терминальные хинол: O_2 оксидоредуктазы (цитохромы *bd*-I, *bd*-II и *bo*₃) переносят электроны от восстановленного убихинона-8 (убихинола-8) на молекулярный кислород (O_2) с образованием воды. Для простоты сукцинат:хинон оксидоредуктаза и другие субстрат-специфичные дегидрогеназы на рисунке не показаны

микробы, живущие в обогащенной H₂S среде, например в кишечном тракте млекопитающих, обладают терминальной оксидазой, нечувствительной к ингибированию этим соединением даже при токсичных микромолярных концентрациях. Эта гипотеза была проверена на E. coli [25]. E. coli – важный член кишечного микробиома человека и других теплокровных животных. Толстая кишка человека обычно содержит несколько штаммов E. coli в любой момент времени [26]. *Е. coli* имеет разветвленную аэробную дыхательную цепь, которая состоит из двух разных NADH:хинон оксидоредуктаз (NDH-I и NDH-II) и трех терминальных хинол:О2 оксидоредуктаз (цитохромов bd-I, bd-II и *bo*₃) [27-32] (рис. 2).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА *bo*3

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

$$2QH_2 + 8H_{in}^+ + O_2 \rightarrow 2Q + 2H_2O + 8H_{out}^+,$$

где QH₂ и Q представляют собой полностью восстановленную и полностью окисленную формы убихинона-8 соответственно [28].

Для того, чтобы восстановить одну молекулу О₂ до двух молекул H₂O, необходимы четыре электрона и четыре протона. Четыре электрона извлекаются при окислении двух QH₂ до двух Q. Окисление двух QH₂ сопровождается выделением четырех Н⁺ в периплазму (рис. 3). Четыре протона (так называемые «химические» протоны) забираются из цитоплазмы. Эта окислительно-восстановительная реакция также сопряжена с перемещением еще четырех протонов (так называемых «перекачиваемых» протонов) из цитоплазмы в периплазму поперек цитоплазматической мембраны - процесс, называемый «перекачкой» протонов. Для переноса всех протонов, взятых из цитоплазмы, оксидаза bo3 использует два входных протонных канала, D и K (рис. 3). Предполагается, что в бактериальных гем-медных оксидазах семейства А D-канал используется для транспортировки всех «перекачиваемых» протонов и части «химических» протонов, тогда как К-канал служит для переноса остальных «химических» протонов [36]. Таким образом, в течение одного каталитического цикла фермента восемь протонов (8H⁺_{in}) захватываются из цитоплазмы и восемь протонов (8H⁺_{out}) высвобождаются в периплазму. В результате пе-



цитоплазма

Рис. 3. Схематическое изображение структуры цитохрома *bo*₃ *Escherichia coli*. Показаны две основные субъединицы – I и II. Субъединица I содержит сайт связывания убихинола, в котором убихинол-8 (QH₂) окисляется до убихинона-8 (Q), гем *b* и биядерный активный сайт, состоящий из гема o_3 и иона меди (Cu_B), в котором O₂ восстанавливается четырьмя электронами до 2H₂O. Кроме того, показаны два входных протонных канала – D-канал и K-канал, а также предполагаемый выходной протонный канал

реноса зарядов поперек мембраны *E. coli* цитохром *bo*₃ генерирует протон-движущую силу.

Получена трехмерная структура bo3-оксидазы E. coli с разрешением 3,5 Å [37]. Фермент состоит из четырех различных субъединиц: I–IV. Субъединицы I, II и III являются гомологами соответствующих субъединиц как митохондриальных, так и бактериальных цитохром соксидаз *аа*₃-типа [38]. Субъединица I несет на себе все редокс-активные металлосодержащие кофакторы: низкоспиновый гем b и биядерный активный центр, состоящий из близко расположенного высокоспинового гема оз и иона меди, называемого Cu_в (рис. 3). Долгое время считалось, что цитохром bo3 содержит два сайта связывания убихинола. Однако недавно было установлено, что эта оксидаза имеет только один сайт связывания убихинола [39]. Электроны, извлеченные из убихинола-8, переносятся на гем b, а затем в биядерный сайт (рис. 3). В биядерном сайте O_2 связывается с гемом o_3 и восстанавливается четырьмя электронами до 2H₂O.

Оксидаза bo_3 экспрессируется в *E. coli*, когда клетки растут при высокой аэрации [40]. Цитохром bo_3 имеет низкое сродство к O₂ (K_D > > 0,3 мМ [41]) по сравнению с цитохромом *bd*-I (*K*_D = 0,28 мкМ [42]).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА bd

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

$$2QH_2 + 4H_{in}^+ + O_2 \rightarrow 2Q + 2H_2O + 4H_{out}^+$$

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

Цитохромы *bd* не содержат иона меди и не обнаруживают гомологии аминокислотных последовательностей с цитохромом *bo*₃ или любыми другими гем-медными оксидазами [34, 35, 49–53]. Оксидазы *bd* создают протон-движущую силу путем трансмембранного разделения зарядов [54, 55]. Однако, в отличие от гем-медных оксидаз, которые являются истинными протонными насосами [36, 56], цитохромы *bd* не способны



Рис. 4. Схематическое изображение структуры цитохрома *bd*-I *Escherichia coli*. Показаны две основные субъединицы – CydA и CydB. Субъединица CydA несет на себе сайт связывания хинола, в котором QH_2 (убихинол-8 или менахинол-8) окисляется до Q (убихинона-8 или менахинона-8), гем *b*₅₅₈, гем *b*₅₉₅ и гем *d*. Последний является сайтом, в котором O_2 восстанавливается четырьмя электронами до $2H_2O$. Также показан один входной протонный канал

перекачивать протоны [57–59]. По этой причине отношение H^+/e^- (количество протонов, доставленных на периплазматическую сторону мембраны на один электрон) равно 1 как для цитохрома *bd*-I [54, 60], так и для цитохрома *bd*-II [60], тогда как в случае цитохрома *bo*₃ оно равно 2 [54].

Получена трехмерная структура цитохрома bd-I E. coli с разрешением 2,7 [61] и 3,3 Å [62]. Из структуры видно, что оксидаза bd-I состоит из четырех субъединиц: двух больших - CydA и CydB, и двух малых – CydX и CydH. Наличие субъединиц CydA и CydB в ферменте известно давно [63, 64]. Субъединица СуdX была обнаружена совсем недавно [65-70]. О существовании субъединицы CydH (также называемой CydY) в цитохроме bd-I стало известно только из трехмерной структуры [61, 62]. Субъединица СуdА содержит сайт окисления хинола и все три редокс-активных металлосодержащих кофактора: низкоспиновый гем b₅₅₈, высокоспиновый гем b_{595} и высокоспиновый гем d (рис. 4). Электроны, высвобождаемые при окислении хинола, переносятся на гем b_{558} , а затем на гем b_{595} и гем d. Последний связывает O₂ и восстанавливает его четырьмя электронами до 2H₂O (рис. 4). Многочисленные экспериментальные исследования указывают на то, что гем b_{595} и гем d действуют как функциональный двухгемовый активный центр [71-84].

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

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

ВЛИЯНИЕ H₂S НА ПОТРЕБЛЕНИЕ O₂ ТЕРМИНАЛЬНЫМИ ОКСИДАЗАМИ *E. coli*.

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

щенными цитохромами bd-I, bd-II и bo3 с помощью метода респирометрии с высоким разрешением. О₂-редуктазная активность этих дыхательных терминальных оксидаз поддерживалась добавленными в избытке восстанавливающими агентами: 2,3-диметокси-5-метил-6-(3-метил-2-бутенил)-1,4-бензохиноном (Q_1) и дитиотреитолом (DTT). Как показано на рис. 5, *a*, добавление NaHS в концентрации ~7 мкМ к цитохрому bo₃ приводит к быстрому и эффективному ингибированию активности фермента. Кажущаяся концентрация полумаксимального ингибирования (*IC*₅₀), измеренная при рН 7,4, составила 1,1 мкМ NaHS [25]. Это значение согласуется с величиной кажущейся константы ингибирования (*K*_i) для митохондриальной цитохром *с*-оксидазы – 0,2–0,45 мкМ H₂S при рН 7,4 [10, 110-112]. Чтобы определить, является ли ингибирование цитохрома bo3 обратимым либо необратимым, после внесения NaHS был добавлен расщепляющий H₂S фермент О-ацетилсерин сульфгидрилаза (OASS) из Entamoeba histolytica (*Eh*OASS) вместе с *O*-ацетил-L-серином (OAS). Известно, что OASS катализирует реакцию β-замещения, в которой β-ацетокси-группа OAS заменяется на HS⁻ с образованием L-цистеина и ацетата [113]. Как видно из рис. 5, а, добавление *Eh*OASS и OAS приводит к быстрому и полному восстановлению О2-редуктазной активности фермента bo₃. Таким образом, было обнаружено, что ингибирование изолированного очищенного цитохрома bo₃ H₂S полностью обратимо. Напротив, в тех же экспериментальных условиях было показано, что как цитохром bd-I, так и цитохром bd-II нечувствительны к присутствию NaHS вплоть до ~60 мкМ этого соединения (рис. 5, *a*).

Чтобы убедиться, что наблюдаемая разница в чувствительности к H₂S между ферментами bo₃- и bd-типов не является следствием солюбилизации либо очистки цитохромов, было также изучено влияние H₂S на потребление O₂ суспензиями клеток E. coli. В этом случае O₂-peдуктазная активность терминальных оксидаз поддерживалась эндогенными субстратами, а не искусственной электрон-донорной системой (DTT и Q₁). Были протестированы три мутантных штамма, каждый из которых имел только одну терминальную оксидазу: цитохром *bd*-I, цитохром *bd*-II или цитохром *bo*₃. Данные, полученные на бактериальных клетках, оказались очень похожими на результаты с изолированными очищенными ферментами [25]. Потребление О₂ мутантными клетками, содержащими цитохром bo₃ в качестве единственной терминальной оксидазы, быстро и полностью ингибировалось NaHS в концентрации 50 мкМ

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

(рис. 5, δ). Подобно тому, что наблюдали в случае изолированной оксидазы bo_3 , добавление *Eh*OASS и OAS приводило к быстрому и полному возобновлению потребления O₂ клетками (рис. 5, δ). Никакого ингибирования потребления O₂ не обнаруживали, если 50 мкМ NaHS добавляли к мутантным клеткам, экспрессирующим в качестве единственной дыхательной



Рис. 5. Влияние H_2S на потребление O_2 терминальными оксидазами Escherichia coli. a – Потребление О2 изолированными очищенными цитохромами bd-I, bd-II и bo3 в присутствии избытка восстановителей (10 мМ DTT и 0,25 мМ Q₁). Добавление 7,2 мкМ NaHS вызывает быстрое ингибирование активности цитохрома bo3. Дальнейшее добавление расщепляющего H₂S фермента О-ацетилсерин сульфгидрилазы из Entamoeba histolytica (EhOASS) вместе с его субстратом О-ацетил-L-серином (OAS) приводит к быстрому и полному восстановлению О₂-редуктазной активности цитохрома bo3. Добавление 58 мкМ NaHS, напротив, не ингибирует потребление O2 ни цитохромом bd-I, ни цитохромом bd-II. б – Потребление О2 клеточными суспензиями мутантных штаммов, которые содержат цитохром bd-I, цитохром bd-II или цитохром bo3 в качестве единственной дыхательной терминальной оксидазы. Потребление О₂ клетками, полагающимися на bo₃ как единственную оксидазу, быстро ингибируется 50 мкМ NaHS. Однако это ингибирование снимается сразу после добавления EhOASS и OAS. Добавление 50 мкМ NaHS не влияет на потребление O2 клетками, имеющими bd-I или bd-II в качестве единственной оксидазы. Рисунок взят из работы Forte et al. [25] с изменениями

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

Похожие результаты были получены Korshunov et al. [114], которые исследовали влияние Na₂S на активность трех цитохромов в мембранных везикулах *E. coli*. Совокупность полученных данных позволяет сделать вывод о том, что ферменты *bd*-типа делают возможным функционирование аэробной дыхательной цепи *E. coli* в присутствии H₂S.

ВЛИЯНИЕ H₂S НА РОСТ КЛЕТОК Е. coli

Ввиду того, что активность оксидаз bd-I и bd-II, в отличие от цитохрома bo_3 , оказалась нечувствительной к H₂S, Forte et al. [25] решили проверить, поддерживают ли один или оба цитохрома bd E. coli также и рост бактерий в присутствии H₂S в культуральной среде. Влияние H₂S на рост клеток было протестировано на четырех штаммах *E. coli*: штамме дикого типа, в котором присутствуют все три терминальные оксидазы, и трех мутантных штаммах, каждый из которых обладает только одной оксидазой — bd-I, bd-II или bo_3 [25]. Было обнаружено, что добавление NaHS в концентрации 200 мкМ замедляет рост клеток дикого типа (рис. 6, *a*). 200 мкМ NaHS резко подавляет рост клеток мутантного штамма, содержащего только цитохром bo_3 (рис. 6, δ). Напротив, после добавления NaHS в той же концентрации к клеткам мутантных штаммов, имеющих в качестве единственной оксидазы либо *bd*-I, либо *bd*-II, кривая роста бактерий вовсе не изменяется (рис. 6, *в*) или изменяется очень мало (рис. 6, *г*).

Таким образом, можно сделать вывод о том, что, в отличие от цитохрома bo_3 *E. coli*, как цитохром bd-I, так и цитохром bd-II этой бактерии способны поддерживать аэробное дыхание и рост клеток в присутствии H₂S. Это также может относиться и к другим бактериям, которые содержат терминальную оксидазу bd-типа в своих аэробных дыхательных цепях. Действительно, Saini et al. [115] недавно обнаружили, что H₂S стимулирует дыхание и рост Mycobacterium tuberculosis, Mycobacterium bovis BCG и Mycobacterium smegmatis. Согласно их интерпретации полученных результатов, индуцированное H₂S ингибирование суперкомплекса цитохрома bcc-aa₃ (служащего одной из двух терминальных оксидаз в дыхательной цепи микобактерий) приводит к перенаправлению электронов от менахинола на цитохром bd, тем самым стимулируя ды-



Рис. 6. Влияние H_2S на рост клеток *Escherichia coli*. Показаны кривые роста штамма дикого типа (*a*) и мутантных штаммов, обладающих цитохромом *bo*₃ (*б*), цитохромом *bd*-I (*в*) или цитохромом *bd*-II (*г*) в качестве единственной дыхательной терминальной оксидазы. Закрашенные и открытые круглые символы указывают на присутствие или отсутствие 200 мкМ NaHS в среде роста соответственно. Рисунок взят из работы Forte et al. [25] с изменениями


Рис. 7. Возможный механизм ингибирования гем-медной оксидазы цитохрома bo_3 *Escherichia coli* H₂S. Различные состояния каталитического биядерного сайта, состоящего из гема o_3 (показано железо гема $o_3 - Fe_0$) и меди Cu_B. Третий редокс-активный металлосодержащий кофактор – гем b, который не является частью биядерного сайта, на рисунке не по-казан

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

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

Ранее было показано, что Н₂S обратимо ингибирует поглощение кислорода цитохром соксидазой из сердца быка [110, 111]. Ингибирование этого митохондриального гем-медного фермента с помощью Н₂S является неконкурентным по отношению к цитохрому c и O₂ [110] и зависит от рН [116]. Начальная скорость инактивации изолированной цитохром с-оксидазы пропорциональна концентрации H_2S , при этом начальная константа скорости (k_{on}) при pH 7,4 равна 2,2 × 10⁴ M⁻¹ · c⁻¹ [10]. Значения K_{i} , измеренные при рН 7,4, оказались в интервале 0,2-0,45 мкМ [10, 110-112]. Н₂S (вероятно, в форме HS^{-}) может связываться с Cu_B в любом из ее редокс-состояний (как с Cu_B¹⁺, так и с $Cu_{B^{2+}})$, а с гемом a_{3} – только в его окисленной форме [10]. Предполагается, что конечный комплекс фермент-ингибитор представляет собой форму «смешанной валентности», в которой Си_А и гем а восстановлены, тогда как гем *a*₃ окислен и связан с H₂S [111, 117]. Си_в в такой форме восстановлена и, возможно, также связана с H₂S, на что указывают данные спектроскопии электронного парамагнитного резонанса [24].

По аналогии с моделью ингибирования митохондриальной цитохром *с*-оксидазы H_2S [10], можно предложить следующую модель H_2S опосредованного ингибирования цитохрома *bo*₃ *E. coli* (рис. 7). В ходе оборотов *bo*₃-оксидазы в стационарном состоянии молекула H_2S (HS⁻) промежуточно связывается с окисленной или восстановленной Cu_B, а затем переносится на окисленный гем *o*₃, тем самым блокируя реакцию этого высокоспинового гема с молекулярным кислородом. В конечном состоянии фермента *bo*₃, заингибированного H_2S , Cu_B восстановлен и, возможно, связан со второй молекулой H_2S (HS⁻) (рис. 7), а низкоспиновый гем *b*, вероятно, находится в восстановленной форме.

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

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

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cuevasanta, E., Denicola, A., Alvarez, B., and Moller, M. N. (2012) Solubility and permeation of hydrogen sulfide in lipid membranes, *PLoS One*, 7, e34562, doi: 10.1371/journal.pone.0034562.
- 2. Forte, E., and Giuffrè, A. (2016) How bacteria breathe in hydrogen sulphide-rich environments, *Biochem. J.*, **38**, 8-11, doi: 10.1042/BIO03805008.
- Li, Q., and Lancaster, J. R., Jr. (2013) Chemical foundations of hydrogen sulfide biology, *Nitric Oxide*, 35, 21-34, doi: 10.1016/j.niox.2013.07.001.
- 4. Murphy, B., Bhattacharya, R., and Mukherjee, P. (2019) Hydrogen sulfide signaling in mitochondria and disease, *FASEB J.*, **33**, 13098-13125, doi: 10.1096/fj.201901304R.
- Powell, C. R., Dillon, K. M., and Matson, J. B. (2018) A review of hydrogen sulfide (H₂S) donors: chemistry and potential therapeutic applications, *Biochem. Pharmacol.*, 149, 110-123, doi: 10.1016/j.bcp.2017.11.014.
- Yang, J., Minkler, P., Grove, D., Wang, R., Willard, B., Dweik, R., and Hine, C. (2019) Non-enzymatic hydrogen sulfide production from cysteine in blood is catalyzed by iron and vitamin B₆, *Commun. Biol.*, 2, 194, doi: 10.1038/ s42003-019-0431-5.
- Kabil, O., and Banerjee, R. (2014) Enzymology of H₂S biogenesis, decay and signaling, *Antioxid. Redox Signal.*, 20, 770-782, doi: 10.1089/ars.2013.5339.
- Shibuya, N., Koike, S., Tanaka, M., Ishigami-Yuasa, M., Kimura, Y., et al. (2013) A novel pathway for the production of hydrogen sulfide from D-cysteine in mammalian cells, *Nat. Commun.*, 4, 1366, doi: 10.1038/ncomms2371.
- Filipovic, M. R., Zivanovic, J., Alvarez, B., and Banerjee, R. (2018) Chemical biology of H₂S signaling through persulfidation, *Chem. Rev.*, **118**, 1253-1337, doi: 10.1021/acs. chemrev.7b00205.
- Nicholls, P., Marshall, D. C., Cooper, C. E., and Wilson, M. T. (2013) Sulfide inhibition of and metabolism by cytochrome *c* oxidase, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1312-1316, doi: 10.1042/BST20130070.
- Szabo, C., Ransy, C., Modis, K., Andriamihaja, M., Murghes, B., et al. (2014) Regulation of mitochondrial bioenergetic function by hydrogen sulfide. Part I. Biochemical and physiological mechanisms, *Br. J. Pharmacol.*, **171**, 2099-2122, doi: 10.1111/bph.12369.
- Corpas, F. J., and Palma, J. M. (2020) H₂S signaling in plants and applications in agriculture, *J. Adv. Res.*, 24, 131-137, doi: 10.1016/j.jare.2020.03.011.
- Carbonero, F., Benefiel, A. C., Alizadeh-Ghamsari, A. H., and Gaskins, H. R. (2012) Microbial pathways in colonic sulfur metabolism and links with health and disease, *Front. Physiol.*, 3, 448, doi: 10.3389/fphys.2012.00448.
- Shatalin, K., Shatalina, E., Mironov, A., and Nudler, E. (2011) H₂S: a universal defense against antibiotics in bacteria, *Science*, **334**, 986-990, doi: 10.1126/science.1209855.
- Kimura, H. (2014) Production and physiological effects of hydrogen sulfide, *Antioxid. Redox Signal.*, 20, 783-793, doi: 10.1089/ars.2013.5309.
- Furne, J., Saeed, A., and Levitt, M. D. (2008) Whole tissue hydrogen sulfide concentrations are orders of magnitude lower than presently accepted values, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **295**, R1479-R1485, doi: 10.1152/ ajpregu.90566.2008.
- Sender, R., Fuchs, S., and Milo, R. (2016) Revised estimates for the number of human and bacteria cells in the body, *PLoS Biol.*, 14, e1002533, doi: 10.1371/journal.pbio.1002533.
- 18. Hugon, P., Dufour, J. C., Colson, P., Fournier, P. E., Sallah, K., and Raoult, D. (2015) A comprehensive reper-

toire of prokaryotic species identified in human beings, *Lancet Infect. Dis.*, **15**, 1211-1219, doi: 10.1016/S1473-3099(15)00293-5.

- Deplancke, B., Finster, K., Graham, W. V., Collier, C. T., Thurmond, J. E., and Gaskins, H. R. (2003) Gastrointestinal and microbial responses to sulfate-supplemented drinking water in mice, *Exp. Biol. Med. (Maywood)*, 228, 424-433, doi: 10.1177/153537020322800413.
- Attene-Ramos, M. S., Wagner, E. D., Gaskins, H. R., and Plewa, M. J. (2007) Hydrogen sulfide induces direct radical-associated DNA damage, *Mol. Cancer Res.*, 5, 455-459, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-06-0439.
- Levitt, M. D., Springfield, J., Furne, J., Koenig, T., and Suarez, F. L. (2002) Physiology of sulfide in the rat colon: use of bismuth to assess colonic sulfide production, *J. Appl. Physiol.*, **92**, 1655-1660, doi: 10.1152/japplphysiol. 00907.2001.
- 22. Suarez, F., Furne, J., Springfield, J., and Levitt, M. (1998) Production and elimination of sulfur-containing gases in the rat colon, *Am. J. Physiol.*, **274**, G727-G733, doi: 10.1152/ajpgi.1998.274.4.G727.
- 23. Jorgensen, J., and Mortensen, P. B. (2001) Hydrogen sulfide and colonic epithelial metabolism: implications for ulcerative colitis, *Dig. Dis. Sci.*, **46**, 1722-1732, doi: 10.1023/A:1010661706385.
- Hill, B. C., Woon, T. C., Nicholls, P., Peterson, J., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1984) Interactions of sulphide and other ligands with cytochrome *c* oxidase. An electron-paramagnetic-resonance study, *Biochem. J.*, 224, 591-600, doi: 10.1042/bj2240591.
- Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., et al. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, 6, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
- Karami, N., Nowrouzian, F., Adlerberth, I., and Wold, A. E. (2006) Tetracycline resistance in *Escherichia coli* and persistence in the infantile colonic microbiota, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **50**, 156-161, doi: 10.1128/AAC.50.1. 156-161.2006.
- 27. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., et al. (2020) Bacterial oxidases of the cytochrome *bd* family: redox enzymes of unique structure, function and utility as drug targets, *Antioxid. Redox Signal.*, doi: 10.1089/ars.2020.8039.
- Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as Acceptor, *EcoSal Plus*, 6, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
- Jünemann, S. (1997) Cytochrome bd terminal oxidase, Biochim. Biophys. Acta, 1321, 107-127, doi: 10.1016/ S0005-2728(97)00046-7.
- Azarkina, N., Borisov, V., and Konstantinov, A. A. (1997) Spontaneous spectral changes of the reduced cytochrome bd, FEBS Lett., 416, 171-174, doi: 10.1016/ S0014-5793(97)01196-4.
- Gavrikova, E. V., Grivennikova, V. G., Borisov, V. B., Cecchini, G., and Vinogradov, A. D. (2009) Assembly of a chimeric respiratory chain from bovine heart submitochondrial particles and cytochrome *bd* terminal oxidase of *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **583**, 1287-1291, doi: 10.1016/ j.febslet.2009.03.022.
- Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovsky, M. I. (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 1398-1413, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.06.016.

- Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., and Pereira, M. M. (2012) The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 629-637, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.09.020.
- 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.
- 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.
- 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.
- Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., et al. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site., *Nat. Struct. Biol.*, 7, 910-917, doi: 10.1038/ 82824.
- Chepuri, V., Lemieux, L. J., Au, D. C.-T., and Gennis, R. B. (1990) The sequence of the *cyo* operon indicates substantial structural similarities between the cytochrome *o* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* and the *aa*₃-type family of the cytochrome *c* oxidases, *J. Biol. Chem.*, 265, 11185-11192.
- Choi, S. K., Schurig-Briccio, L., Ding, Z., Hong, S., Sun, C., and Gennis, R. B. (2017) Location of the substrate binding site of the cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase from *Escherichia coli*, J. Am. Chem. Soc., **139**, 8346-8354, doi: 10.1021/jacs.7b03883.
- Cotter, P. A., Chepuri, V., Gennis, R. B., and Gunsalus, R. P. (1990) Cytochrome *o* (*cyoABCDE*) and *d* (*cydAB*) oxidase gene expression in *Escherichia coli* is regulated by oxygen, pH, and the *fnr* gene product, *J. Bacteriol.*, **172**, 6333-6338, doi: 10.1128/jb.172.11.6333-6338.1990.
- Svensson, M., and Nilsson, T. (1993) Flow-flash study of the reaction between cytochrome *bo* and oxygen, *Biochemistry*, **32**, 5442-5447, doi: 10.1021/bi00071a021.
- 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.
- 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.
- 44. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
- Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Konstantinov, A. A. (1999) A cytochrome bb'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168, J. Biol. Chem., 274, 32810-32817, doi: 10.1074/ jbc.274.46.32810.
- 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.

- Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffrè, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171-234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
- 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.
- Pereira, M. M., Gomes, C. M., and Teixeira, M. (2002) Plasticity of proton pathways in haem-copper oxygen reductases, *FEBS Lett.*, **522**, 14-18, doi: 10.1016/S0014-5793(02)02920-4.
- Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
- Papa, S., Capitanio, G., and Papa, F. (2018) The mechanism of coupling between oxido-reduction and proton translocation in respiratory chain enzymes, *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.*, 93, 322-349, doi: 10.1111/brv.12347.
- 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.
- Borisov, V. B. (2004) Mutations in respiratory chain complexes and human diseases, *Ital. J. Biochem.*, 53, 34-40.
- Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
- 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.
- Wikström, M., Morgan, J. E., and Verkhovsky, M. I. (1997) Proton and electrical charge translocation by cytochrome *c*-oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 299-306, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00152-1.
- 57. Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., et al. (2005) Time-resolved 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.
- 59. 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 b_{595} /heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907–7914, doi: 10.1021/bi800435a.
- 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.
- 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.
- Theßeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., et al. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
- 63. Miller, M. J., and Gennis, R. B. (1983) The purification and characterization of the cytochrome *d* terminal oxidase

complex of the *Escherichia coli* aerobic respiratory chain, *J. Biol. Chem.*, **258**, 9159-9165.

- 64. Kita, K., Konishi, K., and Anraku, Y. (1984) Terminal oxidases of *Escherichia coli* aerobic respiratory chain. II. Purification and properties of cytochrome b_{558} -d complex from cells grown with limited oxygen and evidence of branched electron-carrying systems, *J. Biol. Chem.*, **259**, 3375-3381.
- 65. Sun, Y. H., de Jong, M. F., den Hartigh, A. B., Roux, C. M., Rolan, H. G., and Tsolis, R. M. (2012) The small protein CydX is required for function of cytochrome *bd* oxidase in *Brucella abortus*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.*, 2, 47, doi: 10.3389/fcimb.2012.00047.
- 66. VanOrsdel, C. E., Bhatt, S., Allen, R. J., Brenner, E. P., Hobson, J. J., et al. (2013) The *Escherichia coli* CydX protein is a member of the CydAB cytochrome *bd* oxidase complex and is required for cytochrome *bd* oxidase activity, *J. Bacteriol.*, **195**, 3640-3650, doi: 10.1128/JB.00324-13.
- 67. Hoeser, J., Hong, S., Gehmann, G., Gennis, R. B., and Friedrich, T. (2014) Subunit CydX of *Escherichia coli* cytochrome *bd* ubiquinol oxidase is essential for assembly and stability of the di-heme active site, *FEBS Lett.*, **588**, 1537-1541, doi: 10.1016/j.febslet.2014.03.036.
- Chen, H., Luo, Q., Yin, J., Gao, T., and Gao, H. (2015) Evidence for requirement of CydX in function but not assembly of the cytochrome *bd* oxidase in *Shewanella oneidensis*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1850**, 318-328, doi: 10.1016/j.bbagen.2014.10.005.
- Hobson, J. J., Gallegos, A. S., Atha, B. W., 3rd, Kelly, J. P., Lein, C. D., et al. (2018) Investigation of amino acid specificity in the CydX small protein shows sequence plasticity at the functional level, *PLoS One*, **13**, e0198699, doi: 10.1371/journal.pone.0198699.
- Duc, K. M., Kang, B. G., Lee, C., Park, H. J., Park, Y. M., et al. (2020) The small protein CydX is required for cytochrome *bd* quinol oxidase stability and function in *Salmonella* Typhimurium: a phenotypic study, *J. Bacteriol.*, 202, e00348-19, doi: 10.1128/JB.00348-19.
- 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.
- 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.
- 75. Borisov, V. B., Sedelnikova, S. E., Poole, R. K., and Konstantinov, A. A. (2001) Interaction of cytochrome *bd* with carbon monoxide at low and room temperatures: evidence that only a small fraction of heme b_{595} reacts with CO, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22095-22099, doi: 10.1074/jbc. M011542200.
- 76. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J. L., Zhang, J., et al. (2002) Interactions between heme *d* and heme b_{595} in quinol oxidase *bd* from *Escherichia coli*: a pho-

toselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry*, **41**, 1654-1662, doi: 10.1021/bi0158019.

- 77. Arutyunyan, A. M., Borisov, V. B., Novoderezhkin, V. I., Ghaim, J., Zhang, J., et al. (2008) Strong excitonic interactions in the oxygen-reducing site of *bd*-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes *d* and *b*₅₉₅ is 10 A, *Biochemistry*, **47**, 1752-1759, doi: 10.1021/bi701884g.
- 78. Borisov, V. B. (2008) Interaction of *bd*-type quinol oxidase from *Escherichia coli* and carbon monoxide: heme *d* binds CO with high affinity, *Biochemistry (Moscow)*, **73**, 14-22, doi: 10.1134/S0006297908010021.
- 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 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.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., 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.
- 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.
- Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffrè, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, 56, 265-269.
- 86. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015) Cytochrome *bd* protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: a potential target for next-generation antimicrobial agents, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 565-575, doi: 10.1134/S0006297915050077.
- Giuffrè, A., Borisov, V. B., Mastronicola, D., Sarti, P., and Forte, E. (2012) Cytochrome *bd* oxidase and nitric oxide: From reaction mechanisms to bacterial physiology, *FEBS Lett.*, **586**, 622–629, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.035.
- Giuffrè, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, 1837, 1178–1187, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.01.016.
- 89. Borisov, V., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1995) Peroxide complex of cytochrome *bd*: kinetics of generation and stability, *Biochem. Mol. Biol. Int.*, **37**, 975-982.
- 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.

- Borisov, V. B., Davletshin, A. I., and Konstantinov, A. A. (2010) Peroxidase activity of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 428-436, doi: 10.1134/S000629791004005X.
- 92. Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: An additional defense against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **587**, 2214-2218, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.047.
- Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffru, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *mBio*, 4, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
- 94. Al-Attar, S., Yu, Y., Pinkse, M., 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.
- 95. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.10.006.
- 96. Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome bd with nitric oxide, FEBS Lett., 576, 201-204, doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.013.
- 97. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffrè, A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the 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 Giuffrè, A. (2007) Redox control of fast ligand dissociation from *Escherichia coli* cytochrome *bd*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 355, 97-102, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.118.
- Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., et al. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, 5, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
- 100. Borisov, V. B., Forte, E., Giuffrè, A., Konstantinov, A., and Sarti, P. (2009) Reaction of nitric oxide with the oxidized di-heme and heme-copper oxygen-reducing centers of terminal oxidases: Different reaction pathways and end-products, J. Inorg. Biochem., 103, 1185-1187, doi: 10.1016/ j.jinorgbio.2009.06.002.
- 101. Forte, E., Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Petrosino, M., and Giuffrè, A. (2019) In the respiratory chain of *Escherichia coli* cytochromes *bd*-I and *bd*-II are more sensitive to carbon monoxide inhibition than cytochrome *bo*₃, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1860**, 148088, doi: 10.1016/ j.bbabio.2019.148088.
- 102. Alexeeva, S., Hellingwerf, K. J., and Teixeira de Mattos, M. J. (2003) Requirement of ArcA for redox regulation in *Escherichia coli* under microaerobic but not anaerobic or aerobic conditions, *J. Bacteriol.*, **185**, 204-209, doi: 10.1128/jb.185.1.204-209.2003.
- 103. Atlung, T., and Brøndsted, L. (1994) Role of the transcriptional activator AppY in regulation of the *cyx appA* operon of *Escherichia coli* by anaerobiosis, phosphate starvation, and growth phase, *J. Bacteriol.*, **176**, 5414-5422, doi: 10.1128/jb.176.17.5414-5422.1994.
- 104. Brøndsted, L., and Atlung, T. (1996) Effect of growth conditions on expression of the acid phosphatase (*cyx-appA*)

operon and the *appY* gene, which encodes a transcriptional activator of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.*, **178**, 1556-1564, doi: 10.1128/jb.178.6.1556-1564.1996.

- 105. Belevich, I., Borisov, V. B., Bloch, D. A., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2007) Cytochrome bd from Azotobacter vinelandii: evidence for high-affinity oxygen binding, Biochemistry, 46, 11177-11184, doi: 10.1021/ bi700862u.
- 106. Poole, R. K., Kumar, C., Salmon, I., and Chance, B. (1983) The 650 nm chromophore in *Escherichia coli* is an "Oxy-" or oxygenated compound, not the oxidized form of cytochrome oxidase d: A hypothesis, J. Gen. *Microbiol.*, **129**, 1335-1344, doi: 10.1099/00221287-129-5-1335.
- 107. Kahlow, M. A., Loehr, T. M., Zuberi, T. M., and Gennis, R. B. (1993) The oxygenated complex of cytochrome *d* terminal oxidase: direct evidence for Fe-O₂ coordination in a chlorin-containing enzyme by Resonance Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 5845-5846, doi: 10.1021/ja00066a071.
- 108. Borisov, V. B., Smirnova, I. A., Krasnosel'skaya, I. A., and Konstantinov, A. A. (1994) Oxygenated cytochrome bd from Escherichia coli can be converted into the oxidized form by lipophilic electron acceptors, *Biochemistry* (Moscow), 59, 437-443.
- 109. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome bd terminal oxidase at steady-state: Ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509, doi: 10.1016/ j.bbabio.2011.02.007.
- 110. Petersen, L. C. (1977) The effect of inhibitors on the oxygen kinetics of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **460**, 299-307, doi: 10.1016/0005-2728(77)90216-X.
- 111. Nicholls, P. (1975) The effect of sulphide on cytochrome *aa*₃. Isosteric and allosteric shifts of the reduced α-peak, *Biochim. Biophys. Acta*, **396**, 24-35, doi: 10.1016/0005-2728(75)90186-3.
- 112. Cooper, C. E., and Brown, G. C. (2008) The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 40, 533-539, doi: 10.1007/ s10863-008-9166-6.
- 113. Rabeh, W. M., and Cook, P. F. (2004) Structure and mechanism of *O*-acetylserine sulfhydrylase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 26803-26806, doi: 10.1074/jbc.R400001200.
- 114. Korshunov, S., Imlay, K. R., and Imlay, J. A. (2016) The cytochrome *bd* oxidase of *Escherichia coli* prevents respiratory inhibition by endogenous and exogenous hydrogen sulfide, *Mol. Microbiol.*, **101**, 62-77, doi: 10.1111/ mmi.13372.
- 115. Saini, V., Chinta, K. C., Reddy, V. P., Glasgow, J. N., Stein, A., et al. (2020) Hydrogen sulfide stimulates *Mycobacterium tuberculosis* respiration, growth and pathogenesis, *Nat. Commun.*, **11**, 557, doi: 10.1038/s41467-019-14132-y.
- 116. Nicholls, P., and Kim, J. K. (1982) Sulphide as an inhibitor and electron donor for the cytochrome *c* oxidase system, *Can. J. Biochem.*, **60**, 613-623, doi: 10.1139/o82-076.
- 117. Nicholls, P., Petersen, L. C., Miller, M., and Hansen, F. B. (1976) Ligand-induced spectral changes in cytochrome *c* oxidase and their possible significance, *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 188-196, doi: 10.1016/0005-2728(76)90132-8.

БОРИСОВ, ФОРТЕ

TERMINAL OXIDASE CYTOCHROME *bd* PROTECTS BACTERIA AGAINST HYDROGEN SULFIDE TOXICITY

Review

V. B. Borisov^{1*} and E. Forte²

 ¹ Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, 119991 Moscow, Russia; E-mail: bor@belozersky.msu.ru
 ² Department of Biochemical Sciences, Sapienza University of Rome, I-00185 Rome, Italy

Hydrogen sulfide (H_2S) is often called the third gasotransmitter (after nitric oxide and carbon monoxide), or endogenous gaseous signaling molecule. This compound plays important roles in organisms from different taxonomic groups, from bacteria to animals and humans. In mammalian cells, H_2S has a cytoprotective effect at nanomolar concentrations, but becomes cytotoxic at higher concentrations. The primary target of H_2S is mitochondria. At submicromolar concentrations, H_2S inhibits mitochondrial heme-copper cytochrome *c* oxidase, thereby blocking aerobic respiration and oxidative phosphorylation and eventually leading to cell death. Since the concentration of H_2S in the gut is extremely high, the question arises – how can gut bacteria maintain the functioning of their oxygen-dependent respiratory electron transport chains under such conditions? This review provides an answer to this question and discusses the key role of non-canonical *bd*-type terminal oxidases of the enterobacterium *Escherichia coli*, a component of the gut microbiota, in maintaining aerobic respiration and growth in the presence of toxic concentrations of H_2S in the light of recent experimental data.

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

УДК 577.152.191

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОСЛЕДСТВИЯ УТРАТЫ СУБЪЕДИНИЦЫ 8А ЦИТОХРОМ *с*-ОКСИДАЗЫ

© 2021 Д. Ротко^{1,2}, А.П. Кудин¹, Г. Цурска^{1,3}, Б. Кулавяк², А. Шевчык², В.С. Кунц^{1,3*}

 ¹ Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research, Life & Brain Center, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; E-mail: wolfram.kunz@ukbonn.de
 ² Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology, Polish Academy of Sciences, 02-093 Warsaw, Poland
 ³ Department of Epileptology, University Bonn Medical Center, 53127 Bonn, Germany

> Поступила в редакцию 02.11.2020 После доработки 23.11.2020 Принята к публикации 23.11.2020

В настоящей работе нами был на молекулярном уровне изучен эффект отсутствия наименьшей, кодируемой ядерным геномом субъединицы COX8A цитохром *с*-оксидазы (COX) в фибробластах пациентов с гомозиготной мутацией сайта сплайсинга и в клетках НЕК293Т, чей геном был отредактирован с помощью метода CRISPR/Cas9. В обеих клеточных модельных системах было обнаружено 20-30% остаточной ферментативной активности СОХ. В иммуноблотах белковых комплексов митохондрий, выделенных из обеих клеточных моделей, разделенных с помощью метода нативного электрофореза, почти полностью отсутствовали мономеры или димеры нативной формы COX. Интересно, что суперкомплексы COX, образованные с участием комплекса III, а также с комплексами I и III, сохраняли значительную иммунореактивность, в то время как почти никакой иммунореактивности, приписываемой подструктурам, найдено не было. Это означает, что COX, у которой отсутствует субъединица 8А, стабилизируется в составе суперкомплексов, в то время как её мономеры и димеры подвергаются быстрой деградации. При проведении в исследуемых клеточных моделях дефицита субъединицы СОХ8А транскриптомного анализа с помощью метода секвенирования 3'RNA нам не удалось обнаружить изменения уровня транскрипции генов, участвующих в процессе накопления развернутых белков в матриксе митохондрий, а также в интегрированном ответе на стресс. Таким образом, наши данные убедительно свидетельствуют о том, что для поддержания структурной стабильности мономеров и димеров СОХ необходима наименьшая субъединица цитохром с-оксидазы – СОХ8А.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *с*-оксидаза, субъединица 8А, суперкомплексы дыхательной цепи. **DOI:** 10.31857/S0320972521010048

введение

Окислительное фосфорилирование (OXPHOS, oxidative phosphorylation) в клетках млекопитающих является метаболическим путем, в котором участвуют пять белковых комплексов, расположенных во внутренней митохондриальной мембране (IMM, inner mitochondrial membrane). Поток электронов от NADH или сукцината на молекулу кислорода протекает через серию окислительно-восстановительных реакций, катализиру-

* Адресат для корреспонденции.

емых белковыми комплексами I-IV дыхательной цепи (RC – respiratory chain). Падение окислительно-восстановительного потенциала комплексов I, III и IV облегчает перенос протонов через IMM, а генерируемый трансмембранный протонный градиент используется комплексом V для хемиосмотической продукции ATP. Если в ранней модели «жидкой» мембраны предполагалось, что комплексы дыхательной цепи случайным образом диффундируют в ІММ в виде отдельных образований [1], то в недавних работах было показано, что комплексы RC могут также находиться в виде определенных супрамолекулярных ансамблей [2, 3]. Была определена различная стехиометрия таких белковых суперкомплексов (SC, supercomplex) дыхательной цепи: димер комплекса III, взаимодействующий с одним или двумя комплексами IV (III₂ + IV или III₂ + IV₂); комплекс I в ассоциации с димером комплекса III (I + III₂) и респирасомы, состоящие из комплекса I, димера комплекса III и раз-

Принятые сокращения: BN-PAGE – нативный электрофорез в полиакриламидном геле; COX – цитохром *с*-оксидаза; IMM – внутренняя митохондриальная мембрана; ISR – интегрированный ответ на стресс; mtDNA – митохондриальная DNA; MTS – последовательность митохондриального таргетирования; mtUPR – митохондриальный развернутый белковый ответ; OXPHOS – окислительное фосфорилирование; RC – дыхательная цепь; 3'RNA-Seq – секвенирование 3'RNA; SC – суперкомплекс дыхательной цепи.

личного числа копий комплекса IV (I + III₂ + IV_n) [4, 5]. Однако потенциальное преимущество суперкомплекса в плане катализа благодаря субстратным каналам [6] было оспорено [7], и было предположено, что структура респирасом может способствовать стабилизации отдельных комплексов дыхательной цепи [8–10], чтобы избежать нежелательных белок-белковых взаимодействий в насыщенной белками IMM [11] и снизить образование активных форм кислорода [12].

Цитохром с-оксидаза является терминальным акцептором электронов RC, катализирующим восстановление молекулярного кислорода до воды, которое связано с перекачкой протонов в межмембранное пространство (IMS). В клетках млекопитающих мультибелковый комплекс СОХ состоит из 14 субъединиц [13]. Каталитический центр СОХ образуется пронизывающими IMM субъединицами COX1, COX2 и СОХ3. Эти высокогидрофобные белки кодируются митохондриальной DNA (mtDNA), в то время как другие 11 субъединиц COX (COX4, COX5A, COX5B, COX6A, COX6B, COX6C, COX7A, COX7B, COX7C, COX8A и NDUFA4) кодируются ядерным геномом. Кодируемые ядерным геномом субъединицы COX участвуют в сборке этого фермента, стабилизации структуры и в его взаимодействии с белковыми партнерами в SC дыхательной цепи, а также в процессе регуляции активности цитохром с-оксидазы с участием АТР и тироидных гормонов [14].

Белок СОХ8А является самой маленькой субъединицей СОХ, кодируемой ядерным геномом. В клетках человека этот белок заменен на белок СОХ8В (СОХVІІІН), который обычно экспрессируется в большинстве клад приматов, повсеместная экспрессия СОХ8А считается адаптивным эволюционным изменением в механизме антропоидной RC для оптимизации аэробного энергетического метаболизма [15]. Однако молекулярная роль субъединицы СОХ8А в функционировании СОХ до сих пор не выяснена. Была одна публикация, посвященная исследованию случая дефицита субъединицы COX8A у больного с синдромом Лея [16], при котором наблюдалась недостаточность функционирования СОХ. В этом исследовании мы изучили функциональное влияние потери СОХ8А на биогенез СОХ как индивидуального белкового комплекса электротранспортной цепи и как компонента SC дыхательной цепи.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культура клеток. Эксперименты были проведены на фибробластах кожи человека, полученных от пациента с гомозиготной сплайсинговой мутацией по СОХ8А (клинические и генетические данные см. в работе Hallmann et al. [16]), и на соответствующих по возрасту контрольных фибробластах и клетках почек эмбрионов человека НЕК293Т (любезно предоставлены проф. Майком Райном (Университет Монаша, Австралия) и доктором Давидом Страудом (в настоящее время, университет Мельбурна, Австралия)). Все клетки культивировали в увлажненной инкубационной среде, содержащей 5% СО₂, при 37 °С. Культуральная среда состояла из модифицированной Дульбекко среды Игла (DMEM), дополненной 10% (v/v) фетальной бычьей сывороткой, 2 мМ глутамина, 100 U/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 50 мкг/мл уридина. Каждые три дня (по достижении 95% слияния) клетки пересевали.

Получение СОХ8А-дефицитных клеток с помощью конструкций CRISPR/Cas9. Редактирование генов клеток НЕК293Т проводили с помощью конструкций CRISPR/Cas9, несущих gRNA, нацеленную на экзон 1 гена СОХ8А. Для отбора последовательностей gRNA для конструкций CRISPR/Cas9 использовали алгоритм (https://portals.broadinstitute.org/gpp/public/analysis-tools/sgrna-design) дизайна gRNA Института Брода (Broad Institute). Олигонуклеотиды dsDNA, кодируюшие gRNA, были клонированы в pSpCas9(BB)-2A-GFP («Addgene», США), как было описано ранее [17]. Клетки НЕК293Т были трансфицированы плазмидой, содержащей конструкцию CRISPR/Cas9 с использованием реагента для трансфекции GeneJuice («Sigma», США), в соответствии с инструкциями производителя. Через 24 ч после трансфекции определяли количество жизнеспособных клеток, их разводили и рассевали в 96луночные культуральные планшеты для получения клонов отдельных клеток. После образования клональных колоний отдельные колонии собирали для проведения скрининга с использованием метода секвенирования по Сэнгеру. Препараты общей DNA получали с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit («Qiagen», Германия).

Выделение митохондрий. Выделение митохондрий проводили, как описано ранее [18]. Вкратце, клетки собирали и осаждали при 800 g. Осадок клеток ресуспендировали в ледяном растворе A (250 мМ сахароза, 5 мМ HEPES, pH 7,2) и гомогенизировали в стеклянном гомогенизаторе. Полученный гомогенат центрифугировали при 780 g в течение 10 мин при 4 °C. Супернатанты объединяли и центрифугировали в ледяном растворе A при 9200 g в течение 10 мин при 4 °C. Осадок промывали, ресуспендировали в

ледяном растворе А и центрифугировали при 9200 g в течение 10 мин при 4 °С. Осадок, содержащий митохондрии, ресуспендировали в ледяном растворе В (150 мМ КСІ, 10 мМ НЕРЕЅ, рН 7,2) и хранили во льду.

Электрофоретическое разделение белков и иммунодетекция. Концентрацию белка в образцах определяли с помощью набора Pierce BCA Protein Assay Kit («Thermo Scientific», CША). Для проведения голубого нативного электрофореза в полиакриламидном геле (BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis) аликвоты суспензии митохондрий солюбилизировали раствором, содержащим дигитонин (10% (v/v) глицерин, 1% (v/v) дигитонин, 50 мМ NaCl, 20 мМ Tris-HCl, 0,1 мМ ЭДТА, 1 мМ фенилметилсульфонилфлюорид, рН 7,4). Образцы оставляли во льду в течение 15 мин. Солюбилизированные митохондрии центрифугировали в течение 10 мин при 9200 g и 4 °С и затем собирали супернатант. Раствор красителя (1,5 М аминокапроевая кислота, 50 мМ Bis-Tris-HCl, 5% Кумасси бриллиантовый голубой, pH 7,0) добавляли в супернатант до конечной концентрации 1/3 от общего объема пробы. Образцы, содержащие белки митохондриальных белковых комплексов, наносили на голубой нативный градиентный (4–10%) PAAG (100 мкг белка на дорожку), и проводили разделение митохондриальных белковых комплексов методом электрофореза при 4 °С.

В случае электрофореза белков в полиакриламидном геле в присутствии SDS (SDS-PAGE) аликвоты митохондриального препарата солюбилизировали в 4× буфере для образов Лэммли («Bio-Rad», США), содержащем 1% β-меркаптоэтанол, при 60 °С в течение 15 мин. Образцы наносили вместе с предварительно окрашенным набором белков-маркеров PageRuler ladder («Thermo Scientific», США) на 12,5% SDS-PAGE и разделяли методом электрофореза.

После разделения в BN-PAGE или SDS-PAGE белки из гелей переносили на поливинилиденфторидные мембраны (PVDF – polyvinylidene fluoride) с помощью электроблоттинга. Эти мембраны обрабатывали первичными антителами против конкретных белков: COX1 («Invitrogen», США, 1D6E1A8), COX2 («Invitrogen», CША, 12C4F12), COX4 («Cell Signaling», CIIIA, 4844S), NDUFA9 («Abcam», Великобритания, ab14713), SDHA («Аbcam», Великобритания, ab137040), CORE2 («Abcam», Великобритания, ab14745), субъединицы с АТР-синтазы («Аbcam», Великобритания, ab181243), HSP75 («Abcam», Великобритания, ab182775). Обнаружение первичных антител на мембране проводили с помощью вторичных антител, конъюгированных с пероксидазой хрена, а именно с овечьими анти-мышиными антителами («GE Healthcare», США, NA931V). Визуализацию белкового сигнала проводили с использованием ECL Prime («GE Healthcare», США), в соответствии с инструкциями производителя.

Выделение RNA. Общую РНК выделяли из фибробластов и клеток НЕК293Т фенол-хлороформной экстракцией с последующей очисткой на кремнеземно-мембранных колонках, используя RNeasy Mini Kit («Qiagen», США). Сначала клетки лизировали с использованием реагента TRIzolt («Invitrogen», США), и лизат гомогенизировали с помощью QIAshredder («Qiagen», США). Диссоциацию нуклеопротеиновых комплексов проводили в результате инкубации лизата в течение 5 мин. Разделение фаз проводили с использованием хлороформа и последующим центрифугированием в течение 15 мин при 12 000 g при 4 °С. Собирали водную фазу и осаждали RNA 70%-ным этанолом. Препараты, содержащее RNA, затем наносили на колонки RNeasy Mini Kit spin columns («Qiagen», США) и проводили выделение RNA, в соответствии с инструкциями производителя. Количество RNA и её чистоту в конечном растворе определяли спектрофотометрически с помощью Nanodrop 2000 («Thermo Scientific», США).

Секвенирование 3'RNA (3'RNA-Seq). Для определения уровня экспрессии митохондриальных белков, кодируемых митохондриальным и ядерным геномом, проводили 3'RNA-секвенирование выделенной общей RNA. Число целостности RNA (RNA integrity number) препарата общей RNA контролировалось с помощью Agilent TapeStation («Agilent Technologies», США), и это значение превышало 7 во всех образцах. На основе препарата общей RNA с помощью набора QuantSeq 3'mRNA-Seq Library Prep Kit («Illumina», США) была приготовлена библиотека комплементарных DNA (cDNA, lementary DNA). В результате эта библиотека cDNA была обогащена последовательностями, находящимися в непосредственной близости к 3'-концу транскрибированной полиаденилированной RNA. Секвенирование проводили на платформе для секвенирования HiSeq 2500 («Illumina», США) в режиме высокого выхода.

Обработка данных секвенирования RNA. Выходные файлы секвенирования FASTQ были сопоставлены с геномной сборкой Homo sapiens GRCh38 (hg38), полученной от Genome Reference Consortium с использованием файла аннотаций генов UCSC. Была использована программа «RNA STAR aligner» в режиме двух операций в соответствии с инструкциями по применению программы. Сопоставленные считывания были количественно оценены с помощью алгоритма подсчета признаков (featureCounts). Нормализацию результатов ридов и статистическую обработку полученных данных производили с помощью программного пакета «R/Bioconductor DESeq2» на платформе Galaxy.

Определение ферментативной активности. Спектрофотометрическое определение активности комплекса IV и цитратсинтазы проводили с помощью стандартных методов, которые были описаны ранее [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность СОХ в фибробластах и СОХ8А-дефицитных клетках НЕК293Т. Было проведено определение активности СОХ в препаратах митохондрий фибробластов и клеток НЕК293Т с дефицитом COX8A и в соответствующих контролях (таблица). Чтобы провести определение активности СОХ независимо от содержания митохондрий, активность фермента рассчитывали относительно активности цитратсинтазы (CS, citrate synthase) [19]. Во всех линиях клеток с дефицитом СОХ8А ферментативная активность комплекса IV была снижена, однако остаточная активность СОХ все же сохранялась. Соотношение активности COX/CS в фибробластах с дефицитом СОХ8А было снижено в 5 раз. В каждом из клонов клеток НЕК293Т (#13 и #14) с различными делециями последовательности митохондриального таргетинга (MTS – mitochondrial targeting sequence, рис. 1 в Приложении) соотношение активности COX и CS было снижено примерно в 3 раза. Подробные результаты секвенирования по Сэнгеру двух изученных в работе клонов клеток, редактированных по СОХ8А, приведены на рис. 1а в Приложении.

Комплексы дыхательной цепи в линиях клеток, дефицитных по СОХ8А. Белковые комплексы митохондрий, выделенных из фибробластов и клеток НЕК293Т, были разделены с использованием метода BN-PAGE и затем были обработаны антителами против субъединиц NDUFA9, CORE2, COX4 комплексов I, III и IV дыхательной цепи. Для солюбилизации мембранных белков использовали неионный мягкий детергент дигитонин, который сохраняет исходную стехиометрию SC дыхательной цепи.

В контрольных фибробластах субъединица СОХ4 обнаруживалась в четырех отдельных полностью собранных комплексах СОХ (рис. 1). Большинство этого белка было в равной мере распределено между мономером COX и респирасомами, в то время как также присутствовало меньшее количество белка в димерной форме и в SC, содержащем СШ₂ + СІУ. В фибробластах пациента остаточная активность СОХ была в основном обнаружена в респирасомах, и эта активность не была выявлена ни в мономере СОХ, ни в её димерной форме. Меньшее количество цитохром с-оксидазы также было выявлено в белковом комплексе с молекулярной массой >669 кДа. Интересно, что в СОХ8А-дефицитных фибробластах наблюдалось повышение количества комплексов дыхательной цепи I и III, содержащих субъединицы NDUFA9 и CORE2.

В клетках НЕК293Т дикого типа сигнал СОХ4 был распределен между четырьмя полностью сформированными белковыми комплексами, такими как мономеры COX, димеры $COX, CIII_2 + CIV и респирасомы (рис. 2). Одна$ ко стехиометрия отличалась от таковой, выявленной в фибробластах, поскольку наибольшее количество СОХ было включено в респирасомы, а мономер СОХ был наименее распространенной формой. В СОХ8А-дефицитном клоне #13 клеток НЕК293Т с более короткой делецией в области MTS COX8А наибольшее количество СОХ находилось в составе респирасом. Однако значительная часть СОХ также содержалась внутри SC CIII₂ + CIV и в меньшей мере – в димерах СОХ. При этом практически не наблюдалась мономерная форма СОХ. Количество белковых комплексов, содержащих СОХ в СОХ8Адефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т, было значительно меньше, чем в клетках дикого типа или в клетках клона #13. Большинство остаточ-

Ферментативная активность (мЕ/мг белка)	Контрольные фибробласты	Мутантные по СОХ8А фибробласты	НЕК293Т дикого типа	НЕК293Т СОХ8А- дефицитный клон #13	НЕК293Т СОХ8А- дефицитный клон #14
Цитратсинтаза	61 ± 2	80 ± 5	167 ± 11	189 ± 5	173 ± 6
Цитохром <i>с</i> -оксидаза	81 ± 8	21 ± 2	84 ± 4	32 ± 1	27 ± 4
Комплекс IV/цитратсинтаза	1,32	0,27	0,51	0,17	0,16

Активность ферментов СОХ8А-дефицитных линий клеток



Рис. 1. Стабилизация СОХ в составе суперкомплексов в СОХ8А-дефицитных фибробластах. BN-PAGE с последующим иммуноокрашиванием, 1% дигитонин. Препараты митохондрий из контрольных фибробластов (С) и фибробластов пациента с дефицитом СОХ8А (Р), 100 мкг белка на дорожку. s.e. и l.e. – короткая (short) и долгая (long) экспозиции. Справа – белковые комплексы, содержащие СОХ: IV – мономер СОХ, IV_2 – димер СОХ, III_2 + IV – SC, содержащий СОХ и димер комплекса III, I + III $_2$ + IV $_n$ – респирасомы



Рис. 2. Структура дыхательной цепи в индуцированных CRISPR/Cas9 COX8A-дефицитных клетках HEK293T. BN-PAGE с последующим иммуноокрашиванием, 1% дигитонин. Препараты митохондрий клеток HEK293T дикого типа (clone #13, C13) и дефицитных по COX8A (clone #14, C14), 100 мкг белка на дорожку. s.e. и l.e. – короткая и долгая экспозиция. Справа – COX-содержащие белковые комплексы: IV – мономер COX, IV_2 – димер COX, III_2 + IV – SC, содержащий COX и димер комплекса III, I + III $_2$ + IV $_n$ – респирасомы

ных белков COX обнаруживались внутри респирасом, в то время как в SC CIII₂ + CIV или в мономерных и димерных формах COX были обнаружены только их следовые количества.

Стационарные уровни белков. Стационарные уровни белков отдельных субъединиц дыхательной цепи были определены с помощью метода SDS-PAGE и последующего окрашивания бел-

ков с использованием антител. В соответствии с наблюдаемым снижением уровня белковых комплексов COX в COX8A-дефицитных фибробластах больного, количество белковых субъединиц COX1, COX2, COX4 и COX5A в различной степени тоже было снижено (рис. 3, *a*). В частности, сигналы белков COX 1 и COX5A были едва различимы, в то время как субъединица COX4 была наименее подавленной. Экспрессия других субъединиц других комплексов дыхательной цепи не была нарушена. Также наблюдалось повышение количества CORE2, соответствующее повышению количества белка комплекса III, выявленное при проведении BN-PAGE.

В линиях клеток HEK293T с меньшей (клон #13) или большей (клон #14) делецией в MTS гена *COX8A* уровни белка COX были также значительно снижены (рис. 3, *b*). Как и в случае с фибробластами, наибольшее снижение уровня белка наблюдалось в случае субъединиц COX1 и COX5A, в то время уровень субъединицы COX4 был снижен незначительно. Следует отметить, что снижение количества субъединиц COX было более выражено в клетках клона #14 с большей делецией в MTS COX8A. Однако не было обнаружено повышения уровня белка в случае субъединиц других комплексов RC.

Транскриптомный анализ на основе метода 3'RNA-секвенирования (3'RNA-Seq). Чтобы выяснить, являются ли изменения уровня белков RC результатом регуляции на уровне транскрипции, с использованием метода 3'RNAсеквенирования было изучено влияние дефицита СОХ8А на экспрессию генов, кодирующих белки OXPHOS. Анализ транскриптома фибробластов, дефицитных по СОХ8А, выявил несколько дифференциально экспрессируемых генов белков RC (рис. 4). В частности, наблюдалось небольшое снижение уровня транскрипции кодируемой mtDNA субъединицы COX3 и субъединиц A6L и A ATP-синтазы (log₂(FC): -0,91, -0,87; *p*-value: 0,03, 0,01 соответственно). В то же время незначительно повышался уровень экспрессии кодируемых ядерным геномом субъединиц СОХ7А1 и СОХ7В и количество транскриптов, кодирующих субъединицу 6 комплекса цитохром b-c1, а также субъединицы C3 и DAPIT комплекса V (log₂(FC): 1.16, 0.86, 0,73, 0,68, 0,74; p-value: $6 \cdot 10^{-5}, 0,02, 0,04, 0,03,$ 0,04 соответственно).

Анализ изменений уровня транскрипции в СОХ8А-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т выявил несколько генов, кодирующих субъединицы комплексов дыхательной цепи, которые были дифференцированно экспрессированы (рис. 5). В частности, была повышена экспрессия всех генов mtДHK, кодирующих RC-белки, кроме одного: субъединиц ND1, ND2, ND3, ND4, ND4L комплекса I (log₂(FC): 0,45; 0,47; 0,63; 0,42; 0,61; *p*-value: $2 \cdot 10^{-3}$, $1 \cdot 10^{-3}$, $4 \cdot 10^{-6}$, 0,01, $4 \cdot 10^{-5}$ соответственно), цитохрома *b* комплекса III (log₂(FC): 1,4; *p*-value: $1 \cdot 10^{-21}$ соответственно), субъединиц A и A6L комплекса



Рис. 3. Стационарные уровни отобранных субъединиц комплексов дыхательной цепи в COX8A-дефицитных клетках. SDS-PAGE и последующее окрашивание с использованием антител: *а* – препарат митохондрий контрольных фибробластов (C) и фибробластов больного с дефицитом COX8A (P), 50 мкг белка на дорожку. *b* – Препарат митохондрий из клеток HEK293T дикого типа и клеток HEK293T, дефицитных по COX8A – клон #14 (C14) и клон #13 (C13), 50 мкг белка на дорожку



Рис. 4. Дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие комплексы OXPHOS в COX8А-дефицитных фибробластах. Вулканический график экспрессии генов в фибробластах пациента с дефицитом COX8A в сравнении с контрольными фибробластами. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Выявленные дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие субъединицы комплекса RC, показаны прямоугольниками. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения *P*). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия (p > 0,05), красным показаны гены с повышенной экспрессией (p < 0,05), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией (p < 0,05)



Рис. 5. Дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие комплексы ОХРНОЅ в клетках НЕК293Т СОХ8А-дефицитного клона #14. Вулканический график экспрессии генов в СОХ8А-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т в сравнении с клетками НЕК293Т дикого типа. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Выявлены дифференциально экспрессируемые гены, кодирующие субъединицы комплексов RC, показаны прямоугольниками. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия (p > 0,05), красным показаны гены с повышенной экспрессией (p < 0,05), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией (p < 0,05)

ca V ($\log_2(FC)$: 0,8, 0,65; *p*-value: $3 \cdot 10^{-8}$, $2 \cdot 10^{-6}$ coответственно), а также СОХ2 и СОХ3 комплекca IV $(\log_2(FC): 0.34, 0.61; p$ -value: 0.03, 9.10⁻⁵ coответственно). Экспрессия кодируемых ядерным геномом субъединиц A, B1 и у-комплекса V была также повышена (log₂(FC): 0,72, 0,66, 0,79; *p*-value: $4 \cdot 10^{-4}$, $7 \cdot 10^{-3}$, $2 \cdot 10^{-4}$ соответственно). Однако количество транскриптов кодируемых ядерным геномом субъединиц COX4I1, COX6A1, COX6C, COX7A2, COX7A2L, COX7C (log₂(FC): -0,48, -0,52, -0,41, -0,6, -0,6, -0,4; p-value: $6 \cdot 10^{-3}$, $6 \cdot 10^{-3}$, 0,03, $6 \cdot 10^{-4}$, $4 \cdot 10^{-3}$, 0,03 cootbetственно) и субъединиц NDUFA1, NDUFS8, NDUFB10 комплекса I было понижено ($log_2(FC)$: -0,67, -0,7, -0,51; p-value: $2 \cdot 10^{-3}, 1 \cdot 10^{-3}, 0,04$ coответственно).

Накопление собранных неправильным образом промежуточных структур комплекса **OXPHOS** может индуцировать в митохондриях протеотоксичный стресс и последующую активацию путей передачи сигнала о стрессе от митохондрий в ядро [20]. Чтобы выяснить, приводит ли недостаточность субъединицы COX8A к запуску митохондриальных ретроградных сигнальных путей, экспрессии ключевых регуляторов транскрипции и их нижестоящих мишеней митохондриального развернутого белкового ответа (mtUPR, mitochondrial unfolded protein response) и интегрированного ответа на стресс (ISR – integrated stress response) оценивали с помощью 3'RNA-seq. Активация mtUPR включает в себя повышенную регуляцию экспрессии митохондриальных протеаз контроля качества, таких как ClpP, ClpX, Lonp1, paraplegin и YME1L [21]. Кроме того, при mtUPR происходит индукция экспрессии митохондриальных шаперонов, таких как Hsp70 и Hsp60, приводящая к повышению вероятности правильного свертывания белков [22]. Однако в профиле транскрипции фибробластов с недостаточностью СОХ8А и клона #14 клеток НЕК293Т не наблюдалось усиления регуляции генов, кодирующих перечисленные выше митохондриальные протеазы (CLPP, CLPX, LONP1, SPG7 и YME1L cootветственно) (рис. 6 и 7). Экспрессия генов HSPA9 и HSPD1, кодирующих митохондриальные шапероны, в фибробластах пациента с дефицитом СОХ8А не изменялась (рис. 6), в то время как она увеличивалась в СОХ8А-дефицитном клоне #14 клеток НЕК293Т (рис. 7) $(\log_2(FC): 0.92, 1.03; p$ -value: $4 \cdot 10^{-5}, 1 \cdot 10^{-6}$ cootbetственно), в которых такое повышение экспрессии шаперонов может быть проявлением адаптации к повышению экспрессии генов HSPA9 и *HSPD1*, кодируемых митохондриальной DNA субъединиц RC. Фактор транскрипции ATF5 считается ключевым регулятором специфичного для митохондрий UPR [23, 24]. Как и в случае генов, характерных mtUPR, не было обнаружено повышения экспрессии ATF5 в COX8A-дефицитных фибробластах и клоне #14 клеток HEK293T (рис. 6 и 7).

Интегрированная реакция на стресс – это еще одна форма митохондриального ретроградного сигнального пути стресс-ответа, который характеризуется снижением общего синтеза белка и активацией экспрессии определенных генов комплексного ответа на стресс [25]. Этот процесс может быть инициирован в результате фосфорилирования фактора транскрипции eIF2α четырьмя протеинкиназами, чувствующими стресс эндоплазматического ретикулум (ER stress), mtUPR, нехватку аминокислот и гема [26]. Фосфорилированный фактор eIF2a индуцирует экспрессию центральных регуляторов транскрипции и ISR – ATF4 и его каноническую мишень СНОР [25, 27, 28]. Однако с помощью метода секвенирования 3' RNA не было установлено повышение экспрессии ATF4 и СНОР в СОХ8А-дефицитных фибробластах и клоне #14 клеток НЕК293Т (рис. 6 и 7).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящем исследовании мы изучали влияние потери субъединицы СОХ8А на биогенез цитохром с-оксидазы как индивидуального белкового комплекса электротранспортной цепи и как компонента SC дыхательной цепи. Для выяснения молекулярной и функциональной роли потери СОХ8А в фибробластах пациента с дефицитом СОХ8А и в клетках НЕК293Т С CRISPR/Cas9-индуцированным дефицитом СОХ8А мы провели измерения активности COX, BN-PAGE и SDS-PAGE с последующей иммунодетекцией отдельных субъединиц комплексов RC. Кроме того, с помощью метода секвенирования 3'RNA была проведена оценка изменений транскриптома в СОХ8А-дефицитных клетках.

Биогенез холофермента СОХ является высоко регулируемым процессом с постепенной сборкой кодируемых mtDNA и ядерной DNA субъединиц СОХ, которому способствуют ~30 факторов, кодируемых ядерным геномом [29]. Согласно текущей модульной модели сборки мономера СОХ, СОХ8А присоединяется к промежуточным формам собираемого комплекса СОХ только на поздней стадии в модуле субъединицы, содержащей СОХ2 [30]. Однако недавнее исследование предполагает существование альтернативных способов сборки СОХ в составе респирасом с возможностью прямого включе-



Рис. 6. Экспрессия генов, участвующих в ретроградных сигнальных путях митохондрий в COX8A-дефицитных фибробластах. Вулканический график экспрессии генов в фибробластах пациента с дефицитом COX8A в сравнении с контрольными фибробластами. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Названия отобранных генов показаны в прямоугольниках. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения *P*). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия (p > 0,05), красным показаны гены с повышенной экспрессией (p < 0,05), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией (p < 0,05)



Рис. 7. Экспрессия генов, вовлеченных в митохондриальные ретроградные сигнальные пути COX8A-дефицитного клона #14 клеток HEK293T. Вулканический график экспрессии генов в клетках COX8A-дефицитного клона #14 HEK293T в сравнении с клетками HEK293T дикого типа. Каждая идентифицированная последовательность гена представлена на графике в виде одной точки. Названия отобранных генов показаны в прямоугольниках. По горизонтальной оси отложены значения \log_2 (кратное изменение) между значениями образцов, по вертикальной оси отложены \log_{10} (значения P). Точки серого цвета обозначают статистически недостоверные различия (p > 0,05), красным показаны гены с повышенной экспрессией (p < 0,05), и синим цветом показаны гены с пониженной экспрессией (p < 0,05)

ния субъединиц СОХ в неканонические модули неполной сборки [31]. В соответствии с нашими предыдущими данными [16], в фибробластах пациента с дефицитом СОХ8А вызванная нонсенс-мутацией деградация mRNA приводила к резкому снижению уровня транскрипта СОХ8А. В этих клетках наблюдалось выраженное снижение активности СОХ, приближающееся к ~20% от контрольных значений. В обоих клонах НЕК293Т (#13 и #14), содержащих делеции в MTS COX8A, остаточная активность COX составляла примерно 30% от контрольных значений, что указывает на то, что потеря СОХ8А оказывает пагубное воздействие на ферментативную активность СОХ. Однако наличие поддающейся измерению остаточной активности СОХ означает, что сборка связанного с респирасомами холофермента СОХ может протекать и без участия субъединицы СОХ8А.

С помощью метода BN-PAGE было показано, что снижение ферментативной активности СОХ связано с пониженным общим количеством СОХ-содержащих белковых комплексов. В митохондриях фибробластов пациента с дефицитом СОХ8А и клеток НЕК293Т клона #14 (содержащих бо́льшую делецию в МТЅ СОХ8А) остаточный белок СОХ был в значительной степени ассоциирован с респирасомами, в то время как мономерная форма практически не обнаруживалась. Это говорит о том, что стабильность мономеров СОХ была сильно нарушена в случае потери СОХ8А, в то время как остаточная активность COX, содержащаяся внутри SC, была защищена от деградации белка. Примечательно, что аналогичные наблюдения были сделаны в случае клеток, содержащих мутации в факторах сборки COX, а именно в SURF1 и COA6. Общее количество СОХ было снижено и большая часть остаточного СОХ была включена в респирасомы, в то время как мономерная форма COX с трудом обнаруживалась [32, 33]. Миссенс-вариант структурной субъединицы СОХ5А, кодируемой ядерным геномом, привел к дефициту СОХ и сниженной стабильности мономеров СОХ, но уровень СОХ внутри респирасом оставался без изменений [34]. Эти результаты поддерживают предположение о том, что одна из ключевых физиологических ролей респирасом заключается в стабилизации индивидуальных белковых комплексов, что особенно актуально в случае их неправильной сборки и снижения стабильности [35].

Структура комплексов дыхательной цепи I и III не была нарушена в клетках с дефицитом COX8A, и их количество оказалось даже повышенным, что может возникать как компенсаторный феномен с целью увеличения доступности респирасом для стабилизации оставшегося COX. Компенсаторное повышение уровня комплексов I и III RC наблюдалось также в фибробластах с мутациями в белках SURF1 и COA6 [32, 33].

Выявленное с помощью метода BN-PAGE понижение количества COX соответствовало результатам SDS-PAGE, продемонстрировавших пониженные стационарные уровни всех тестированных субъединиц COX (COX1, COX2, COX5A, COX4) в COX8А-дефицитных линиях клеток. Стационарные уровни комплекса III были повышены в фибробластах пациента, что соответствовало увеличению общего количества комплекса III, содержащего SC. Репрезентативные субъединицы других комплексов остались без изменений.

Чтобы выяснить, могут ли изменения уровня белков быть вызваны изменениями экспрессии генов, был проведен транскриптомный анализ. В фибробластах с дефицитом COX8A результаты 3'RNA-секвенирования не показали системного увеличения транскрипции генов, кодирующих RC-белки. Это означает, что компенсаторное увеличение количества субъединиц комплексов I и III дыхательной цепи в СОХ8А-дефицитных фибробластах происходит, скорее всего, на пост-трансляционном уровне. Так, в СОХ8А-дефицитных клетках НЕК293Т клона #14 повышена экспрессия почти всех митохондриальных белок-кодирующих генов, в то время как экспрессия нескольких кодируемых ядерным геномом субъединиц, участвующих в сборке СОХ на её поздней стадии, понижена. Это говорит о сложном характере регуляции генной экспрессии в этой клеточной линии.

Далее мы исследовали, может ли нарушенная сборка СОХ, вызванная мутациями в COX8A. индуцировать протеотоксический стресс вследствие накопления орфанных промежуточных продуктов сборки COX. mtUPR является ретроградным сигнальным путем, который инициируется с целью восстановления белкового гомеостаза в митохондриях [36]. Его активация происходит с целью исправления неправильно свернутых или неправильно собранных митохондриальных белков. Активация mtUPR включает в себя повышенную регуляцию экспрессии митохондриальных ААА-протеаз: ClpP, ClpX и Lonp1, локализованных внутри митохондриального матрикса, и параплегина и YME1L, которые заякорены в IMM [21]. Кроме того, mtUPR индуцирует повышение регуляции экспрессии митохондриальных шаперонов для содействия свертыванию вновь транслированных пептидов [20]. Однако в транскриптоме СОХ8А-дефицитных фибробластов нет изменений экспрессии генов, ассоциированных с активацией mtUPR. Экспрессия протеаз, осуществляющих контроль качества митохондрий, в клетках HEK293T также остается без изменений. Повышение количества транскриптов митохондриальных шаперонов в клетках HEK293T клона #14 можно объяснить скоординированной экспрессией ядерных и митохондриальных геномов для увеличения способности шаперона сворачивать белок.

Интегрированный ответ на стресс – еще один митохондриальный ретроградный сигнальный путь, инициируемый активацией четырех протеинкиназ (Gcn2, HRI, Prk и Perk), которые активируются в ответ на широкий спектр стрессовых состояний, включая нехватку аминокислот и гема, mtUPR и стресс эндоплазматического ретикулума (ER stress) [26]. Их сигнальные пути сходятся на фосфорилировании фактора транскрипции eIF2 α , которое приводит к глобальному снижению трансляции белка и селективной активации генов стресс-ответа [25]. ATF4 является нижележащей мишенью фосфорилированного eIF2α и основным транскрипционным регулятором ISR. Одной из его канонических мишеней является фактор транскрипции СНОР [27, 28]. Поскольку в транскриптоме обоих СОХ8А-дефицитных типах клеток не наблюдалось изменений, ассоциированных с ISR, вполне вероятно, что дефицит COX из-за мутаций в COX8A не приводит к инициации ISR. В целом отсутствие активации митохондриальной ретроградной передачи сигнала в обоих СОХ8Адефицитных типах клеток предполагает отсутствие вредного накопления неправильно собранных промежуточных структур СОХ либо из-за быстрого обмена неправильно собранных промежуточных структур, либо из-за включения необычных модулей СОХ в респирасомы.

Таким образом, полученные нами результаты предполагают, что субъединица СОХ8А необходима для поддержания структурной стабильности мономеров и димеров СОХ. Потеря

- Hackenbrock, C. R., Chazotte, B., and Gupte, S. S. (1986) The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 18, 331-368, doi: 10.1007/ BF00743010.
- Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria, *EMBO J.*, **19**, 1777-1783, doi: 10.1093/emboj/19.8.1777.
- Acín-Pérez, R., Fernández-Silva, P., Peleato, M. L., Pérez-Martos, A., and Enriquez, J. A. (2008) Respiratory active mitochondrial supercomplexes, *Mol. Cell*, 32, 529-539, doi: 10.1016/j.molcel.2008.10.021.

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

СОХ8А приводит к дефициту СОХ, который выражается в снижении количества белковых комплексов СОХ и снижению его ферментативной активности. Остаточный СОХ в СОХ8А-дефицитных клетках стабилизируется внутри респирасом, и при этом не происходит активации mtUPR, вызванного неправильно собранными промежуточными структурами мономера СОХ.

Финансирование. Выполнение данной работы поддержано Deutsche Forschungsgemeinschaft (гранты №№ KU 911/21-2 и KU 911/22-1, предоставлены W.S.K.; и гранты №№ ZS 99/3-2 и ZS 99/4-1, предоставлены GZ). Эта работа также была поддержана Польским национальным научным центром (грант № 2019/34/A/NZ1/00352, предоставлен AS; и грант № 2015/18/E/NZ1/ 00737, предоставлен BK) и исследовательской и инновационной программой Европейского Союза Horizon 2020 имени Марии Склодовской-Кюри (грант № 665735 (Віо4Меd)).

Благодарности. Авторы хотят выразить благодарность проф. Майку Райяну и доктору Дэвиду Страуду за предоставленную линию клеток HEK293T.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в настоящей работе с участием людей, соответствовали этическим стандартам Национального комитета по этике научных исследований и Хельсинкской Декларации 1964 г. ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого участника исследования было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http:// protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/journal/ 10541), том 86, вып. 1, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 4. Schägger, H., and Pfeiffer, K. (2001) The ratio of oxidative phosphorylation complexes I-V in bovine heart mitochondria and the composition of respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **276**, 37861-37867, doi: 10.1074/jbc. M106474200.
- Greggio, C., Jha, P., Kulkarni, S. S., Lagarrigue, S., Broskey, N. T., et al. (2017) Enhanced respiratory chain supercomplex formation in response to exercise in human skeletalm, *Cell Metab.*, 25, 301-311, doi: 10.1016/j.cmet. 2016.11.004.
- 6. Lapuente-Brun, E., Moreno-Loshuertos, R., Acín-Pérez, R., Latorre-Pellicer, A., Colaś, C., et al. (2013) Supercomplex

assembly determines electron flux in the mitochondrial electron transport chain, *Science*, **340**, 1567-1570, doi: 10.1126/science.1230381.

- Fedor, J. G., and Hirst, J. (2018) Mitochondrial supercomplexes do not enhance catalysis by quinone channeling, *Cell Metab.*, 28, 525-531.e4, doi: 10.1016/j.cmet.2018.05.024.
- Calvaruso, M. A., Willems, P., Van den Brand, M., Valsecchi, F., Kruse, S., et al. (2012) Mitochondrial complex III stabilizes complex I in the absence of NDUFS4 to provide partial activity, *Hum. Mol. Genet.*, 21, 115-120, doi: 10.1093/hmg/ddr446.
- Schägger, H., De Coo, R., Bauer, M. F., Hofmann, S., Godino, C., and Brandt, U. (2004) Significance of respirasomes for the assembly/stability of human respiratory chain complex I, *J. Biol. Chem.*, **279**, 36349-36353, doi: 10.1074/jbc.M404033200.
- Tropeano, C. V. Aleo, S. J., Zanna, C., Roberti, M., Scandiffio, L., et al. (2020) Fine-tuning of the respiratory complexes stability and supercomplexes assembly in cells defective of complex III, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1861, 148133, doi: 10.1016/j.bbabio.2019.148133.
- Hirst, J. (2018) Open questions: respiratory chain supercomplexes-why are they there and what do they do? *BMC Biol.*, 16, 5-8, doi: 10.1186/s12915-018-0577-5.
- Maranzana, E., Barbero, G., Falasca, A. I., Lenaz, G., and Genova, M. L. (2013) Mitochondrial respiratory supercomplex association limits production of reactive oxygen species from complex I, *Antioxid. Redox Signal.*, 19, 1469-1480, doi: 10.1089/ars.2012.4845.
- Zong, S., Wu, M., Gu, J., Liu, T., Guo, R., and Yang, M. (2018) Structure of the intact 14-subunit human cytochrome c oxidase, *Cell Res.*, 28, 1026-1034, doi: 10.1038/s41422-018-0071-1.
- Sinkler, C. A., Kalpage, H., Shay, J., Lee, I., Malek, M. H., Grossman, L. I., and Hüttemann, M. (2017) Tissue- and condition-specific isoforms of mammalian cytochrome c oxidase subunits: from function to human disease, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, 2017, 1534056, doi: 10.1155/2017/1534056.
- Goldberg, A., Wildman, D. E., Schmidt, T. R., Hüttemann, M., Goodman, M., Weiss, M. L., and Grossman, L. I. (2003) Adaptive evolution of cytochrome c oxidase subunit VIII in anthropoid primates, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 5873-5878, doi: 10.1073/pnas.0931463100.
- Hallmann, K., Kudin, A. P., Zsurka, G., Kornblum, C., Reimann, J., et al. (2016) Loss of the smallest subunit of cytochrome c oxidase, COX8A, causes Leigh-like syndrome and epilepsy, *Brain*, 139, 338-345, doi: 10.1093/brain/awv357.
- Ran, F. A., Hsu, P. D., Wright, J., Agarwala, V., Scott, D. A., and Zhang, F. (2013) Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system, *Nat. Protoc.*, 8, 2281-2308, doi: 10.1038/nprot.2013.143.
- Bednarczyk, P., Wieckowski, M. R., Broszkiewicz, M., Skowronek, K., Siemen, D., and Szewczyk, A. (2013) Putative structural and functional coupling of the mitochondrial BKCa channel to the respiratory chain, *PLoS One*, 8, e68125, doi: 10.1371/journal.pone.0068125.
- Wiedemann, F. R., Vielhaber, S., Schröder, R., Elger, C. E., and Kunz, W. S. (2000) Evaluation of methods for the determination of mitochondrial respiratory chain enzyme activities in human skeletal muscle samples, *Anal. Biochem.*, 279, 55-60, doi: 10.1006/abio.1999.4434.
- Pellegrino, M. W., Nargund, A. M., and Haynes, C. M. (2013) Signaling the mitochondrial unfolded protein response, *Biochim. Biophys. Acta*, **1833**, 410-416, doi: 10.1016/j.bbamcr.2012.02.019.
- Quirós, P. M., Langer, T., and López-Otín, C. (2015) New roles for mitochondrial proteases in health, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 16, 345-359, doi: 10.1038/ nrm3984.

- Fiorese, C. J., and Haynes, C. M. (2017) Integrating the UPRmt into the mitochondrial maintenance network, *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **52**, 304-313, doi: 10.1080/ 10409238.2017.1291577.
- 23. Wang, Y. T., Lim, Y., McCall, M. N., Huang, K. T., Haynes, C. M., Nehrke, K., and Brookes, P. S. (2019) Cardioprotection by the mitochondrial unfolded protein response requires ATF5, *Am. J. Physiol.*, **317**, H472-H478, doi: 10.1152/ajpheart.00244.2019.
- Fiorese, C. J., Schulz, A. M., Lin, Y. F., Rosin, N., Pellegrino, M. W., and Haynes, C. M. (2016) The transcription factor ATF5 mediates a mammalian mitochondrial UPR, *Curr. Biol.*, 26, 2037-2043, doi: 10.1016/j.cub.2016.06.002.
- Harding, H. P., Zhang, Y., Zeng, H., Novoa, I., Lu, P. D., et al. (2003) An integrated stress response regulates amino acid metabolism and resistance to oxidative stress, *Mol. Cell*, 11, 619-633, doi: 10.1016/S1097-2765(03)00105-9.
- Taniuchi, S., Miyake, M., Tsugawa, K., Oyadomari, M., and Oyadomari, S. (2016) Integrated stress response of vertebrates is regulated by four eIF2α kinases, *Sci. Rep.*, 6, 32886, doi: 10.1038/srep32886.
- Palam, L. R., Baird, T. D., and Wek, R. C. (2011) Phosphorylation of eIF2 facilitates ribosomal bypass of an inhibitory upstream ORF to enhance CHOP translation, *J. Biol. Chem.*, 286, 10939-10949, doi: 10.1074/jbc.M110.216093.
- Fessler, E., Eckl, E. M., Schmitt, S., Mancilla, I. A., Meyer-Bender, M. F., et al. (2020) A pathway coordinated by DELE1 relays mitochondrial stress to the cytosol, *Nature*, 579, 433-437, doi: 10.1038/s41586-020-2076-4.
- Timón-Gómez, A., Nývltová, E., Abriata, L. A., Vila, A. J., Hosler, J., and Barrientos, A. (2018) Mitochondrial cytochrome c oxidase biogenesis: recent developments, *Semin. Cell Dev. Biol.*, **76**, 163-178, doi: 10.1016/j.semcdb. 2017.08.055.
- Bourens, M., Boulet, A., Leary, S. C., and Barrientos, A. (2014) Human COX20 cooperates with SCO1 and SCO2 to mature COX2 and promote the assembly of cytochrome c oxidase, *Hum. Mol. Genet.*, 23, 2901-2913, doi: 10.1093/ hmg/ddu003.
- Lobo-Jarne, T., Pérez-Pérez, R., Fontanesi, F., Timón-Gómez, A., Wittig, I., et al. (2020) Multiple pathways coordinate assembly of human mitochondrial complex IV and stabilization of respiratory supercomplexes, *EMBO J.*, **39**, e103912, doi: 10.15252/embj.2019103912.
- Kovářová, N., Čížková Vrbacká, A., Pecina, P., Stránecký, V., Pronicka, E., Kmoch, S., and Houštěk, J. (2012) Adaptation of respiratory chain biogenesis to cytochrome c oxidase deficiency caused by SURF1 gene mutations, *Biochim. Biophys. Acta*, 1822, 1114-1124, doi: 10.1016/ j.bbadis.2012.03.007.
- Baertling, F., van den Brand, M. A. M., Hertecant, J. L., Al-Shamsi, A., van den Heuvel, L. P., et al. (2015) Mutations in COA6 cause cytochrome c oxidase deficiency and neonatal hypertrophic cardiomyopathy, *Hum. Mutat.*, 36, 34-38, doi: 10.1002/humu.22715.
- Baertling, F., Al-Murshedi, F., Sánchez-Caballero, L., Al-Senaidi, K., Joshi, N. P., et al. (2017) Mutation in mitochondrial complex IV subunit COX5A causes pulmonary arterial hypertension, lactic acidemia, and failure to thrive, *Hum. Mutat.*, 38, 692-703, doi: 10.1002/humu. 2321035.
- 35. Schäfer, E., Seelert, H., Reifschneider, N. H., Krause, F., Dencher, N. A., and Vonck, J. (2006) Architecture of active mammalian respiratory chain supercomplexes, *J. Biol. Chem.*, **281**, 15370-15375, doi: 10.1074/jbc.M513525200.
- Qureshi, M. A., Haynes, C. M., and Pellegrino, M. W. (2017) The mitochondrial unfolded protein response: Signaling from the powerhouse, *J. Biol. Chem.*, 292, 13500-13506, doi: 10.1074/jbc.R117.791061.

MOLECULAR AND FUNCTIONAL EFFECTS OF LOSS OF CYTOCHROME *c* OXIDASE SUBUNIT 8A

D. Rotko^{1,2}, A. P. Kudin¹, G. Zsurka^{1,3}, B. Kulawiak², A. Szewczyk², and W. S. Kunz^{1,3*}

¹ Institute of Experimental Epileptology and Cognition Research, Life & Brain Center, University of Bonn, 53127 Bonn, Germany; E-mail: wolfram.kunz@ukbonn.de

² Laboratory of Intracellular Ion Channels, Nencki Institute of Experimental Biology,

Polish Academy of Sciences, 02-093 Warsaw, Poland

³ Department of Epileptology, University Bonn Medical Center, 53127 Bonn, Germany

In this work we studied molecular and functional effects of the loss of the smallest nuclear encoded subunit of cytochrome c oxidase COX8A in fibroblasts from a patient with a homozygous splice site mutation and in CRISPR/Cas9 genome-edited HEK293T cells. In both cellular model systems, between 20 to 30% of the residual enzymatic activity of cytochrome c oxidase (COX) was detectable. In immunoblots of BN-PAGE separated mitochondria from both cellular models almost no monomers and dimers of the fully assembled COX could be visualized. Interestingly, supercomplexes of COX formed with complex III and also with complexes I and III retained considerable immunoreactivity, while nearly no immunoreactivity attributable to subassemblies was found. That indicates that COX lacking subunit 8A is stabilized in supercomplexes, while monomers and dimers are rapidly degraded. With transcriptome analysis by 3'-RNA sequencing we failed to detect in our cellular models of COX8A deficiency transcriptional changes of genes involved in the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and the integrated stress response (ISR). Thus, our data strongly suggest that the smallest subunit of cytochrome c oxidase COX8A is required for maintenance of the structural stability of COX monomers and dimers.

Keywords: mitochondria, cytochrome c oxidase, subunit 8A, respiratory chain super complexes

УДК 577.151.43

МЕХАНИЗМ ИНГИБИРОВАНИЯ ЦИТОХРОМ *с*-ОКСИДАЗЫ ТРИТОНОМ X-100

© 2021 И.П. Олейников^{1,2}, Н.В. Ацаркина^{2*}, Т.В. Выгодина², А.А. Константинов²

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, 119992 Москва, Россия ² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет

имени М.В. Ломоносова, 119992 Москва, Россия; электронная почта: azarkina@yahoo.com

Поступила в редакцию 15.09.2020 После доработки 30.10.2020 Принята к публикации 30.10.2020

Известно, что тритон X-100 (ТХ) обратимо ингибирует активность цитохром с-оксидазы (ЦО). В работе проанализирован механизм ингибирования. Действие ТХ не направлено на реакцию ЦО с цитохромом c, не вызывает переход фермента в «медленную» форму и не связано с мономеризацией препарата. ТХ полностью подавляет кислород-редуктазную реакцию, однако ингибирование предотвращается и частично обращается додецилмальтозидом (ДМ) – детергентом, применяемым для поддержания ЦО в растворе. Показано, что ДМ конкурирует с TX за связывание с ЦО в соотношении 1/1, K = 0.3 мМ, сродство ДМ к ферменту составляет 1,2 мМ. В окисленном ферменте ТХ вызывает спектральный ответ с максимумом при 421 нм и $[TX]_{1/2} = 0,28$ мМ, связанный, предположительно, с гемом a_3 . При взаимодействии ЦО с избытком H_2O_2 TX влияет на равновесие кислородных интермедиатов каталитического центра, ускоряя переход F_I-607→F_{II}-580, ингибирует образование ферментом О2 и, в меньшей степени, подавляет каталазную парциальную активность. Наблюдаемые эффекты могут объясняться ингибированием превращения в каталитическом цикле интермедиата F_{II}-580 в свободную окисленную форму. В работающем ферменте TX подавляет внутримолекулярный перенос электронов между гемами а и аз. В условиях эффективного ингибирования оксидазной реакции пероксидазная парциальная активность ЦО достаточно устойчива к ТХ. Эти особенности указывают на нарушение проводимости протонного канала К. Мы полагаем, что ТХ взаимодействует с ЦО в центре связывания желчных кислот (ЦСЖК), расположенном на субъединице I в устье К-канала и контактирующем с амфипатическими регуляторами ЦО [Buhrow et al. (2013) Biochemistry, 52, 6995-7006]. По-видимому, ТХ является аналогом физиологического лиганда ЦСЖК, а молекула ДМ – аналогом эндогенного фосфолипида, связывающегося на границе ЦСЖК и контролирующего эффективное сродство к лиганду.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *с*-оксидаза, тритон X-100, регуляция, К-канал, амфипатические лиганды. **DOI**: 10.31857/S032097252101005X

введение

Цитохром *с*-оксидаза (ЦО) катализирует восстановление кислорода до воды электронами, приходящими по дыхательной цепи от субстратов цикла Кребса, открывая возможность использования энергии восстановления кислорода для энергетических нужд клетки в процессе окислительного фосфорилирования. В ходе оксидазной реакции электроны поступают на ЦО от цитохрома *с* и переносятся к месту восстановления кислорода по цепочке редокс-центров, входящих в структуру фермента (схема 1).

цитохром $c \Longrightarrow Cu_A \Longrightarrow rem a \Longrightarrow rem a_3/Cu_B \Longrightarrow O_2$

Схема 1. Последовательность переноса электронов по цепочке редокс-центров ЦО.

Кислород восстанавливается в биядерном центре, который образован высокоспиновым гемом a_3 и ионом меди Cu_B. В реакции O₂ \rightarrow H₂O участвуют 4 «субстратных» протона, поступающих в биядерный центр из матрикса митохондрий (цитоплазмы бактерий). С восстановлением кислорода сопряжен также перенос четырех «помповых» протонов через мембрану (в направлении изнутри наружу). Все протоны, участвующие в каталитическом цикле ЦО, переносятся внутри белка по протонным каналам К

Принятые сокращения: ДМ – додецилмальтозид; ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; ТХ – тритон X-100; ЦО – цитохром *c*-оксидаза; ЦСЖК – центр связывания желчных кислот; K_i – константа ингибирования; $K_{i(app)}$ – кажущаяся константа ингибирования; Ох – свободная окисленная форма фермента; WST-1 – водорастворимый тетразолий.

^{*} Адресат для корреспонденции.

и D, названным по образующим их критическим аминокислотным остаткам. Более подробно с механизмом работы ЦО можно ознакомиться в недавно вышедших обзорах [1–4].

Как и другие мембранные белки, ЦО отличается высокой гидрофобностью. Первой стадией в процедуре ее выделения является солюбилизация: растворение окружающей мембраны при помощи детергентов и встраивание белка в образованные детергентом мицеллы. В солюбилизированной форме ЦО проходит дальнейшие стадии выделения и очистки, хранится и используется в экспериментах.

Уже при первых попытках выделения ЦО было замечено, что от типа применяемого детергента зависит не только выход препарата, но и его свойства [5, 6]. Так, многие детергенты, называемые «жесткими» (тритон, SDS и в меньшей степени холат и дезоксихолат) позволяют экстрагировать ЦО из мембраны наиболее полно и получать стабильный и гомогенный конечный продукт, но обладающий крайне низкой ферментативной активностью. Более «мягкие» агенты (Tween, октилглюкозид, додецилмальтозид), напротив, при меньшем количественном выходе позволяют получить активный препарат [7, 8]. Важным обстоятельством оказался обратимый характер инактивации в первом случае: препарат ЦО, выделенный с применением тритона X-100 (TX) или желчных кислот, частично или полностью реактивируется при последующей замене детергента на Tween, Emasol, или алкилглюкозиды [7, 9]. В связи с этим «жесткие» детергенты продолжают применять для солюбилизации мембран, но заменяют их на «мягкие», чтобы поддерживать в растворимой форме конечный препарат.

Феномен ингибирования активности митохондриальной ЦО тритоном Х-100 обсуждался в литературе многократно [5, 7, 10–15]. В ранних работах снижение оксидазной активности в присутствии ТХ обычно связывали с вытеснением детергентом молекул фосфолипидов, прочно ассоциированных с белком в нативных условиях [16]. Отмечалось также, что обработка препарата ТХ ведет к мономеризации белковых комплексов [9, 17, 18], тогда как в составе мембраны (естественной или искусственной), а также в растворе «мягких» неионных детергентов ЦО из митохондрий быка находится в форме димеров [16, 19]. Позже были получены данные о том, что фермент, перешедший в неактивную конформацию, в присутствии ТХ теряет способность к реактивации после прохождения каталитического цикла [14, 15].

В последние годы основное внимание исследователей ЦО сосредоточилось на физиологи-

ческой регуляции фермента, позволяющей быстро и гибко подстраивать его активность под текущие энергетические запросы клетки. Недавно в трехмерной структуре ЦО была выявлена особая гидрофобная площадка, названная центром связывания желчных кислот (ЦСЖК) [20]. Предполагается, что в ЦСЖК могут обратимо связываться амфипатические (содержащие гидрофобные и гидрофильные участки) лиганды — регуляторы активности. В работе Antalik et al. [21] высказывается и ТХ.

В представленной работе мы исследовали взаимодействие ТХ с митохондриальной ЦО более подробно, чем это делалось раньше. Нами обнаружена конкуренция ТХ с «мягким» детергентом додецилмальтозидом (ДМ). Также мы установили место действия ТХ в цепочке переноса электронов по редокс-центрам ЦО и вероятную мишень ингибирования в каталитическом цикле оксидазной реакции. Полученные данные указывают на то, что эффекты ТХ в отношении ЦО имитируют действие природного регулятора ее активности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. В работе использовали следующие реактивы высокой степени чистоты: рН-буферы (Tris и Hepes) и этилендиаминтетрауксусная кислота (ЭДТА) («Amresco», США); β-D-додецилмальтозид квалификации «Sol-grade» («Anatrace», США); о-дианизидин дихлорид («ICN Biomedicals Inc», США); L-аскорбиновая кислота, цитохром c из сердца лошади (тип III), дитионит натрия, цианид калия, феррицианид калия, ферроцианид калия, тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД), каталаза (23000 ед/мг белка), супероксиддисмутаза, тритон Х-100, гексааммиакат рутения (RuAm) («Sigma-Aldrich», США); водорастворимый тетразолий (water soluble tetrazolium, WST-1) («Dojindo Molecular Technologies», Япония).

Концентрированный раствор перекиси водорода (~30%) («Sigma-Aldrich», США) хранили при +4 °C, перед опытом проверяли концентрацию спектрофотометрически, используя $\varepsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$ [22], и готовили разведения нужной концентрации. Все растворы готовили на воде, очищенной с помощью системы MilliQ.

Препараты. Цитохром *с*-оксидаза была выделена из митохондрий сердца быка. Говяжьи сердца получали на скотобойне ООО «Пушкинский мясной двор», Пушкино, Московская обл., и хранили во льду до начала процедуры выделения. Выделение начинали через 2–3 ч после забоя и проводили по модифицированному методу Fowler et al. [23], как описано ранее [24]. Выделенный препарат хранили расфасованным небольшими порциями при -70 °C. Концентрацию фермента определяли по разностному спектру оптического поглощения (образец, восстановленный дитионитом, минус окисленный), используя $\Delta \varepsilon_{605-630} = 27 \text{ мM}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$.

Спектрофотометрические измерения проводили в стандартной кювете («Hellma», Германия) с затемненными боковыми гранями и длиной оптического пути 10 мм. Абсолютные спектры поглощения записывали при ширине оптической щели 2 нм и скорости записи 2 нм/с на двулучевом спектрофотометре Cary Bio 300 («Varian», США). Кинетику изменений оптического поглощения регистрировали на спектрофотометре SLM-Aminco DW-2000 («SLM Instruments», США) в двуволновом режиме.

Измерения ферментативных активностей. Оксидазная активность. Скорость потребления кислорода регистрировали амперометрически с помощью закрытого электрода Кларковского типа на приборе Oxygraph («Hansatech», Великобритания) в термостатируемой ячейке объемом 1 мл при 25 °С и постоянном перемешивании. Измерения проводили в базовой среде, содержащей 50 мМ Tris/Hepes, 0,1 мМ ЭДТА, при рН 7,5. Перед опытом в базовую среду добавляли детергент (додецилмальтозид или тритон Х-100) в указанной концентрации. Концентрация обоих детергентов приводится в тексте в мМ (0,05% додецилмальтозид ≈ 1,0 мМ; 0,1% тритон Х-100 ≈ 1,6 мМ). В качестве субстрата дыхания использовали 5 мМ аскорбат (как восстановитель цитохрома c), 0,1 мМ ТМФД (как редокс-медиатор) и 10 мкМ цитохром с (как непосредственный донор). Концентрация ЦО в пробе составляла 15-54 нМ. Скорость дыхания при расчетах корректировали, вычитая самоокисление аскорбата.

Пероксидазную активность ЦО измеряли, как описано ранее [25]. Перекисное окисление 0,2 мМ о-дианизидина в присутствии перекиси водорода регистрировали спектрофотометрически в двуволновом режиме по разности поглощений при 432 нм относительно волны сравнения 580 нм. В среду опыта (базовая среда + 50 мМ КСl, pH 7,5, детергенты в указанных концентрациях) вносили ЦО и о-дианизидин. Окисления о-дианизидина не наблюдалось и реакцию запускали добавлением H₂O₂.

Образование супероксида ЦО в присутствии избытка перекиси измеряли на спектрофотометре, классическим методом [26] – по чувствительному к супероксиддисмутазе восстановлению солей тетразолия, которое катализируется ЦО в присутствии милимолярных концентраций H_2O_2 . Восстановление водорастворимого красителя WST-1 регистрировали по возрастанию экстинкции при 440 нм относительно волны сравнения 550 нм. Среда опыта: базовая среда + 50 мМ KCl, pH 7,5, 1 мМ ДМ.

Каталазную активность ЦО регистрировали с помощью кислородного электрода, как описано ранее [27]. Измерения проводили в 30 мМ калий-фосфатном буфере, рН 7,2, содержащем 0,1 мМ ЭДТА и 1 мМ додецилмальтозид («каталазная среда»). В качестве субстрата использовали 12 мМ H₂O₂. Наблюдаемое выделение кислорода полностью подавлялось цианидом.

Перевод ЦО в форму F₁-607 по Николсу. Аэробный раствор фермента в течение 2 мин продували окисью углерода. Как впервые показано в работе Nicholls и Chanady [28], эта процедура позволяет получить оксоферрильный комплекс F₁-607 с высоким выходом и практически без примеси F_{II}-580. Процесс протекает непосредственно в биядерном центре и состоит в его двухэлектронном восстановлении молекулами СО с последующим двухэлектронным окислением кислородом и образованием in situ стехиометрического количества Н₂O₂ и интермедиата F₁-607. Процедуру проводили в закрытой кювете, в присутствии 0,1 мМ феррицианида (для предотвращения восстановления гема а) и каталазы, добавляемой в объеме 1 мкл до концентрации 690 ед/мл (для полного удаления возможных следов экзогенной перекиси).

Обработку данных проводили при помощи программы Origin 7 и 9 Microcal (https://www.originlab.com/).

Погрешность измерений. Эксперименты по исследованию кинетики изменений концентрации кислорода и изменений оптического поглощения проводили в трех независимых повторах, разброс данных не превышает 10%. В экспериментах по титрованию ферментативных активностей тритоном X-100, реактивации ингибированного фермента додецилмальтозидом, титрованию тритоном спектральных изменений и определению концентрационной зависимости константы скорости каждое измерение проводили в 2-4 независимых повторах, на рисунках приводятся средние значения, оценка погрешности соответствует разбросу экспериментальных точек относительно проведенных теоретических кривых. В эксперименте по титрованию оксидазной активности додецилмальтозидом каждое измерение проводили в 3-10 независимых повторах, на рисунке приводятся средние значения и среднеквадратичные отклонения. В случае спектров поглощения погрешность определяется отношением сигнала к шуму. В экс-

периментах по титрованию спектральных изменений перекисью водорода погрешность соответствует размеру символов на рисунке.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

ТХ ингибирует цитохромоксидазную активность, конкурируя с ДМ за связывание с ЦО. Ингибирование активности в присутствии ТХ. Наши исследования показали, что тритон Х-100 подавляет оксидазную активность ЦО в детергентном растворе, что соответствует литературным данным [7, 11, 13, 21]. Ингибирование наблюдается при использовании в качестве субстрата окисления как естественного (цитохром *c*, см. ниже), так и искусственного (ТМФД, данные не приведены) донора электронов. В обоих случаях ингибирование может достигать 100% и предотвращается, а также обращается при повышении в среде концентрации ДМ.

На рис. 1 показано ингибирующее действие ТХ на оксидазную реакцию, катализируемую солюбилизированной формой ЦО из сердца быка. Ингибирование существенно ослабляется при повышении в среде концентрации ДМ. Скорость убыли кислорода в аэробном растворе, содержащем фермент и дыхательный субстрат (цитохром c, аскорбат и ТМФД) на фоне 1 мМ ДМ, уменьшается примерно на треть после внесения 1 мМ ТХ (рис. 1, a, кривая I). И наоборот, добавление 1 мМ ДМ к ферменту, работающему с пониженной скоростью в присутствии 1 мМ ТХ, приводит к ускорению оксидазной реакции примерно в 2,5 раза (рис. 1, а, кривая 2). Как видно из приведенных данных, ингибирующий эффект TX развивается за время смешивания, тогда как после добавления ДМ скорость выходит на стационарный уровень в течение 10-20 с.

Более детально влияние ДМ на ингибирующее действие ТХ показано на рис. 1, *б*, на котором приведены зависимости активности ЦО от концентрации ТХ в присутствии разных концентраций ДМ. Во всех случаях экспериментальные данные хорошо описываются гиперболической функцией, стремящейся к нулю (ингибирование 100%) при бесконечно большой концентрации ингибитора. При этом видно, что повышение в среде [ДМ] приводит к сдвигу действующих концентраций ТХ в сторону больших величин. Мы аппроксимировали полученные данные уравнением:

$$v = \frac{100}{1 + \frac{[l]}{K_{i(app)}}},$$
(1)

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

где v — нормализованная скорость реакции (в процентах), [I] — концентрация ТХ и $K_{i(app)}$ — кажущееся значение константы ингибирования в присутствии заданной концентрации ДМ. При наибольших концентрациях ДМ (рис. 1, δ , кривые 4 и 5) в области субмилимолярных концентраций ингибитора можно заметить небольшую лаг-фазу. Мы предполагаем, что она может быть вызвана включением части молекул ТХ в образованные ДМ пустые мицеллы.

На рисунке 1, *в* значения $K_{i(app)}$, полученные в результате аппроксимации экспериментальных данных уравнением (1), представлены как функция от концентрации ДМ. При концентрациях ДМ ниже 20 мМ зависимость имеет линейный характер, что указывает на конкуренцию в соотношении 1/1 между ТХ и ДМ за связывание с ферментом. Тангенс угла наклона прямой к оси Х равен отношению сродства к ЦО ингибитора (TX) и его конкурента (ДМ), которое составляет 1/4. Экстраполяция к нулевому значению [ДМ] позволяет оценить истинную величину $K_i = 0,3$ мМ. Отрезок, отсекаемый на оси абсцисс в области отрицательных значений, дает оценку константы диссоциации комплекса ДМ с ферментом, $K_{c} = 1,2$ мМ.

В рамках предположения о конкуренции между ДМ и ТХ за взаимодействие с ЦО можно выразить $K_{i(app)}$ следующим образом:

$$K_{i(app)} = K_i \cdot (1 + \frac{[C]}{\kappa_c}), \qquad (2)$$

где K_i — истинная константа ингибирования, [C] — концентрация ДМ и K_c — константа диссоциации комплекса ЦО с ДМ. Подставив выражение (2) в уравнение (1), получаем теоретическую зависимость, связывающую скорость работы ЦО с концентрациями ТХ и ДМ, а также с величинами их сродства к ферменту:

$$v = \frac{100}{1 + \frac{[l]}{K_{i} \cdot (1 + \frac{[C]}{K_{c}})}}.$$
 (3)

Реактивация додецилмальтозидом ЦО, предварительно ингибированной ТХ. На рис. 2, а представлены результаты титрования ДМ активности ЦО, предварительно сниженной добавленным ТХ. Видно, что по мере возрастания [ДМ] активность фермента восстанавливается до некоторого конечного уровня, который тем выше, чем меньше в среде ТХ. В диапазоне концентраций 0–7 мМ ДМ через экспериментальные точки проведены теоретические кривые, соответствующие функции (3) (см. выше), в которой значения [Л] и [С] заданы условиями



Рис. 1. ТХ ингибирует оксидазную активность ЦО. a – Потребление кислорода в ходе оксидазной реакции. Концентрацию кислорода регистрировали электродом Кларка. В базовую среду добавляли дыхательный субстрат (аскорбат + ТМФД + цитохром c) и через 1 мин запускали реакцию внесением ЦО (показано стрелкой). Исходно среда содержала 1 мМ ДМ (кривая I) либо 1 мМ ТХ (кривая 2). Последующие добавления ТХ и ДМ обозначены стрелками. δ – Концентрационная зависимость ингибирующего действия ТХ на фоне различных концентраций ДМ. Скорость цитохромоксидазной реакции определяли по убыли кислорода. За 100% принята активность фермента в присутствии 1 мМ ДМ и без ТХ. Среда опыта исходно содержала ДМ в следующих концентрациях: I - 1 мМ (черные кружки); 2 - 5 мМ (белые кружки); 3 - 10 мМ (черные треугольники); 4 - 20 мМ (белые треугольники); 5 - 30 мМ (квадраты). Скорость работы фермента в присутствии TX определяли через 1 мин после добавления ингибитора. Остальные условия, как на панели a. Через экспериментальные точки проведены теоретические кривые, соответствующие уравнению (1) (см. в тексте). Начальные участки кривых 4 и 5 аппроксимированы эмпирически подобранной функцией, описывающей наблюдаемую лаг-фазу (см. в тексте). $a - Зависимость полученных значений <math>K_{i(арр)}$ от концентрации ДМ. Стрелками показаны отрезки, отсекаемые аппроксимирующей прямой на осях Y и X, которые представляют, соответственно, значение истинной (в отсутствие ДМ) K_i для ТХ и сродство ДМ к ферменту, K_c

опыта, а значения констант K_i и K_c являются подгоночными параметрами, изменяющимися в пределах 0,08–0,23 мМ и 0,2–1,5 мМ соответственно (см. подпись к рис. 2, *a*). Видно, что функция (3) хорошо описывает экспериментальные данные, однако лишь при концентрациях ДМ ниже 10 мМ. Далее, согласно теоретическим кривым, восстановление активности должно достигать 100% (при бесконечной концентрации ДМ), тогда как в условиях эксперимента активность выходит на конечный уровень, который всегда ниже, чем скорость работы фермента без ТХ. Так, при минимальном добавлении ТХ (0,96 мМ) ингибированной остается ~25% активности (рис. 2, *a*, кривая *I*), при максимальном (16 мМ) – ~90%.

На рисунке 2, б показана зависимость активности ЦО от концентрации ДМ в среде опыта. Видно, что при 5 мМ ДМ скорость работы фермента практически не отличается от контрольных условий (1 мМ ДМ). При более высокой концентрации детергента активность достоверно снижается: при 10 мМ ДМ – примерно на 20%, а при 20 мМ ДМ и выше – на 30% от контрольного уровня. Подавление активности ЦО высокими концентрациями ДМ могло бы объяснить отклонение экспериментальных данных в опыте по реактивации фермента от теоретической зависимости (3) (рис. 2, *a*), а также, возможно, отклонение концентрационной зависимости K_{i(app)} от линейной функции при [ДМ] > 20 мМ (рис. 1, *в*).

Механизм ингибирующего действия ТХ на ЦО. Для получения информации о механизме взаимодействия ТХ с ферментом мы определили место ингибирования в цепочке переноса электронов, исследовали некоторые изменения, вызываемые ТХ в биядерном центре и сравнили влияние, оказываемое ТХ на катализируемые ЦО парциальные реакции.

ТХ ингибирует перенос электронов с гема а на гем a_3 . Последовательность переноса электронов между редокс-центрами ЦО показана на схеме 1. Поскольку ингибирование ТХ обнаруживается при использовании в качестве донора не только цитохрома c, но и ТМФД, оно, очевидно, направлено не на взаимодействие ЦО с внешним донором, а на одну из дальнейших, внутримолекулярных стадий переноса электронов.

Для того, чтобы выяснить, влияет ли TX на стационарное распределение электронов между гемом *a* и биядерным центром в работающем ферменте, ЦО инкубировали в аэробных условиях в присутствии восстановителя (аскорбат + ТМФД), следя за изменениями уровня восстановления гемов по мере протекания реакции. Результаты приведены на рис. 3.

На рис. 3, *а* представлен опыт, в котором регистрировали изменения поглощения в видимой области (605–630 нм). Это позволяло следить за восстановлением гема *a*, вклад которого в суммарное поглощение при данных длинах волн составляет 80% [29]. Сравнивая контрольную кривую *l* с кривыми 2–4, можно видеть, что внесение в среду опыта ТХ приводит к увеличению уровня восстановления гема *a* в стационарных условиях оксидазной реации. При максимальной концентрации ТХ (16 мМ) уровень восстановления повышается в 3 раза по сравнению с контролем. Кроме того, в присутствии ТХ время протекания реакции до наступления анаэробиоза также увеличивается по сравнению с

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

контролем, что объясняется замедлением работы фермента. Оба эффекта выражены тем сильнее, чем выше концентрация ТХ.

На рис. 3, б представлены результаты аналогичного эксперимента, в котором регистрировалась разность оптического поглощения при



Рис. 2. ДМ восстанавливает активность ЦО, ингибированной ТХ. а – Реактивация ЦО, предварительно ингибированной ТХ, после добавления ДМ. Условия эксперимента как на рис. 1, δ , но среда опыта исходно содержала не ДМ, а TX в следующих концентрациях: 1 – 0,96 мМ (черные кружки); 2 – 3,2 мМ (белые кружки); 3 – 6,4 мМ (черные треугольники); 4 – 11,2 мМ (белые треугольники); 5-16 мМ (квадраты). Скорость работы фермента определяли через 1 мин после добавления ДМ (2 мин после начала дыхания). За 100% принята активность ЦО в среде без ТХ в присутствии 1 мМ ДМ. Данные, представленные на кривых 1-5, аппроксимированы функцией (3) (см. в тексте), в которой параметры K_i и K_c равны, соответ-ственно: 0,15 мМ и 0,2 мМ (кривая I); 0,13 мМ и 0,32 мМ (кривая 2); 0,08 мМ и 0,33 мМ (кривая 3); 0,12 мМ и 1,0 мМ (кривая 4); 0,23 мМ и 1,5 мМ (кривая 5). б – Зависимость активности ЦО от концентрации ДМ. Скорость работы фермента определяли через 1 мин после начала дыхания в среде с различными концентрациями ДМ. За 100% принята активность ЦО в присутствии 1 мМ ДМ.



Время, с

Рис. 3. ТХ замедляет перенос электрона на гем аз. а – Влияние ТХ на стационарный уровень восстановления гема а в работающем ферменте. Уровень восстановления регистрировали по разности оптического поглощения при (605-630 нм). Опыт проводили в наполненной до верха закрытой кювете. Оксидазную реакцию запускали добавлением субстрата дыхания (5 мМ аскорбат + 0,1 мМ ТМФД, показано стрелкой) после 30 с записи базовой линии в присутствии аэробной ЦО (0,5 мкМ) в среде опыта (базовая среда + 50 мМ КСІ, рН 8,1, 1 мМ ДМ). При этом сигнал выходил на уровень, соответствующий восстановлению в стационарных условиях реакции. После исчерпания в среде кислорода (показано стрелками) происходило полное восстановление ЦО, и сигнал резко возрастал. Отсутствие оптических изменений после добавления дитионита (показано стрелкой) демонстрирует, что в анаэробиозе достигнуто 100% восстановление гема а. Кривая 1 (сплошная линия) – контроль, кривые 2-4 - среда опыта исходно содержала 3,2 мМ (пунктирная линия), 6,4 мМ (линия обозначена точками) и 16 мМ (линия обозначена пунктиром с точками) ТХ соответственно. б – Регистрация суммарного уровня восстановления гемов а и аз при наступлении анаэробиоза. Опыт ставили как на панели а, но регистрировали разность оптического поглощения в полосе при 444-500 нм, что позволяло отслеживать уровень суммарного восстановления гемов a и a_3 . Представлена завершающая часть кривых, соответствующая восстановлению фермента после наступления анаэробиоза. Концентрация ЦО – 1,2 мкМ, остальные условия как на панели а. Кривая 1 (сплошная линия) - контроль, кривая 2 (пунктир) – среда опыта исходно содержала 6,4 мМ ТХ

444 нм против 500 нм (γ -полосы восстановленных гемов *a* и a_3 , имеющих в этой области приблизительно равную молярную экстинкцию [29]). Целью данного опыта было исследование кинетики восстановления гемов при наступлении анаэробиоза (стационарная фаза работы фермента не приводится, для удобства сравнения кривые совмещены по вертикали). Как видно из рисунка, добавление ТХ существенно замедляет вторую (медленную) фазу суммарного восстановления, которая связана преимущественно с гемом a_3 [21, 30].

Влияние ТХ на биядерный центр окисленной ЦО. Спектральный сдвиг. Обнаружилось, что ТХ влияет не только на активность фермента, но и на его спектр поглощения (рис. 4). При добавлении ТХ к окисленной форме ЦО возрастает поглощение в районе 420-424 нм (рис. 4, *a*). На разностном спектре относительно окисленного образца появляется максимум с центром при 421 нм (рис. 4, *б*), что указывает на участие в спектральных изменениях гема *a*₃. Спектральный ответ развивается быстро (за 3 мин после добавления 0,16 мМ ТХ) и стабилен в течение нескольких часов. Амплитуда ответа растет с увеличением концентрации ТХ.

На рисунке 4, в показана зависимость амплитуды ответа при 421 нм от концентрации ТХ. Зависимость имеет вид кривой с насыщением при [TX] \approx 3 мМ, коэффициент экстинкции достигает значения 6 мМ⁻¹·см⁻¹. Данные хорошо аппроксимируются гиперболической функцией. Величина C_{50%} (концентрация TX, вызывающая полумаксимальный ответ) = 0,28 мМ (сравн. с величиной $K_{i(app)}$ = 0,56 мМ, полученной в сходных условиях, см. рис. 1, б и в).

Связывание цианида. Известно, что препарат ЦО может находиться в «быстрой» и «медленной» формах [31], которые различаются скоростью взаимодействия с лигандами. Соотношение двух форм сильно варьирует в зависимости от методики выделения. Переход фермента в «медленную» форму может провоцироваться многими факторами, в том числе - воздействием детергента. В некоторых работах [14, 15] высказывается предположение, что причиной ингибирования ЦО в присутствии ТХ может быть переход фермента в неактивную форму. Спектрально «быстрая» и «медленная» формы отличаются друг от друга положением максимума в полосе Соре окисленного фермента (424 нм vs 417 нм соответственно) [31]. Как видно из рис. 4, *a*, в присутствии ТХ поглощение в области Соре немного сдвигается не в коротко-, а в длинноволновую сторону, однако суммарный пик в обоих случаях гетерогенен, и количественно определить соотношение двух форм в образце



Рис. 4. ТХ влияет на спектр поглощения гема $a_3^{3^+}$. *а* – Абсолютные спектры поглощения аэробно окисленной ЦО без добавок (*1*, сплошная линия) и в присутствии 16,8 мМ ТХ (*2*, пунктирная линия). Базовая среда, рН 7,5, 1мМ ДМ. Концентрация ЦО – 0,5 мкМ. Спектры записаны после 2 мин инкубации фермента в среде опыта. *б* – Разностные спектры поглощения относительно аэробно окисленной ЦО (1,22 мкМ) зарегистрированы через 6 мин после добавления ТХ. Концентрация ТХ: *1* – 0,16 мМ; *2* – 0,32 мМ; *3* – 0,64 мМ; *4* – 1,28 мМ; *5* – 2,56 мМ. Базовая среда, рН 7,0, 1 мМ ДМ. *в* – Представлена зависимость амплитуд (421–406 нм) разностных спектров, показанных на панели *б*, от концентрации добавленного ТХ

не представляется возможным. Мы решили выяснить, не вызывает ли ТХ образование «медленной» формы ЦО, изучив его влияние на реакцию фермента с типичным лигандом окисленного биядерного центра, цианидом. Замедление этой реакции считается классическим признаком перехода фермента в «медленную форму».

На рисунке 5 представлены результаты опыта, в котором спектрально (при длинах волн 434—412 нм) регистрировалась кинетика образования комплекса ЦО с цианидом. На рисунке приведена зависимость константы скорости образования комплекса от концентрации цианида. Зависимость имеет двухфазный характер и линейна в обеих фазах. При этом в интервале концентраций КСN 0,2—20 мМ значения констант скорости в контроле и в присутствии ТХ практически совпадают. Наблюдаемые величины хорошо согласуются с литературными данными [31] и указывают на преобладание в обоих случаях «быстрой» формы.

Влияние ТХ на парциальные реакции ЦО. Полный каталитический цикл ЦО включает стадии, связанные с превращениями перекиси водорода. Это соединение образуется в биядерном центре в процессе восстановления ферментом кислорода и представляет собой природный лиганд окисленного гема *а*₃.

Влияние ТХ на стационарные концентрации оксоферрильных интермедиатов в псевдокаталазном цикле. В отличие от реакции с цианидом, взаимодействие перекиси водорода с биядер-



Схема 2. Псевдокаталазный цикл ЦО. Показано состояние биядерного центра: Ох – свободный окисленный $(a_3^{3+}/ Cu^{2+}/Tyr244)$, F_I-607 – оксоферрильное состояние I $(a_3^{4+} = O^{2-}/Cu^{2+}/Tyr244^{\bullet})$, F_{II}-580 – оксоферрильное состояние II $(a_3^{4+} = O^{2-}/Cu^{2+}/Tyr244)$. См. текст.

ным центром ЦО не ограничивается присоединением к окисленному гему a_3 , и образующийся аддукт подвергается дальнейшим превращениям [32, 33]. Эти превращения соответствуют частным стадиям каталитического цикла фермента в так называемой пероксидазной фазе реакции [34, 35]. Последовательность превращений описывается схемой 2, которая получила название «псевдокаталазного цикла».

Как можно видеть из схемы 2, в условиях большого избытка Н₂O₂ над ферментом возникает многостадийная циклическая реакция, в которой расходуется H₂O₂ и устанавливаются стационарные концентрации интермедиатов F₁-607 и F_{II}-580. Аналогичные кислородные интермедиаты ЦО регистрируются в пероксидазной фазе реакции восстановления кислорода методами быстрой кинетики. Они представляют собой оксоферрильные формы, в которых атом железа гема а₃ находится в высшей степени окисления (+4). В интермедиате F₁-607 на близлежащем остатке Туг244 имеется электронная вакансия, которая заполняется при поступлении в биядерный центр 3-го электрона, что соответствует превращению F_1 -607 \rightarrow F_{11} -580 [1, 3, 4, 35]. Феррильные формы фермента F₁-607 и F_{II}-580 отличаются от свободной окисленной формы ЦО спектрами поглощения, что позволяет следить за их образованием спектрофотометрически. Друг от друга спектры F_I-607 и F_{II}-580 отличаются в видимой области (максимумы поглощения, соответственно, при 607 и 580 нм на разностном спектре относительно свободного окисленного фермента), а в области Соре практически совпадают.

На рис. 6 показана зависимость стационарной концентрации оксоферрильных интермедиатов ЦО от количества добавленной перекиси водорода и влияние на эту зависимость ТХ. Измерения в области Соре (рис. 6, *a*) свидетельствуют о том, что при концентрации H_2O_2 20–100 мкМ практически весь фермент переходит в смесь оксоферрильных форм F_1 -607 и F_{II} -580. При дальнейшем увеличении концентрации перекиси происходит постепенное исчезновение формы F_{I} -607 (рис. 6, δ), которая переходит в форму F_{II} -580, как это следует из сохранения суммарного ответа в области Соре (панель *a*). Можно видеть, что ТХ не оказывает заметного влияния на переход свободной формы окисленной ЦО в смесь оксоферрильных состояний при добавлении низких микромолярных концентраций перекиси (панель *a*), но сильно ускоряет исчезновение формы F_{I} -607 нм при дальнейшем увеличении концентрации H_2O_2 (панель δ): так, при 20 мкМ H_2O_2 концентрация F_{I} -607 в опыте и контроле почти одинакова, а при 100 мкМ H_2O_2 она в 3 раза ниже в присутствии ТХ, чем в контроле.

Такое уменьшение стационарной концентрации интермедиата F_{I} -607 под действием TX в псевдокаталазном цикле можно было бы объяснить двояко. Во-первых, TX мог бы воздействовать непосредственно на оксоферрильный комплекс F_{I} -607, дестабилизируя его. Во-вторых, к снижению стационарного уровня F_{I} -607 должно также приводить уменьшение скорости его образования в цикле (реакция I на схеме 2) либо увеличение скорости его распада (реакция II на схеме 2). Для проверки первой возможности мы исследовали влияние TX на стабильность формы F_{I} -607, полученной не в результате



Рис. 5. ТХ не влияет на скорость образования цианидного комплекса окисленной ЦО. Связывание цианида с ферментом регистрировали спектрофотометрически. Концентрация ЦО – 1 мкМ. Среда опыта (базовая среда, pH 8,1, 1 мМ ДМ) содержала 100 мкМ феррицианид калия для предотвращения восстановления ЦО в цианидном комплексе. Реакцию запускали добавлением КСN, после чего ее скорость регистрировали по возрастанию оптического поглощения при 434–412 нм. Приведены рассчитанные константы скорости образования комплекса псевдопервого порядка (k). Через экспериментальные точки, полученные в контрольных условиях (без ТХ, черные кружки) и в присутствии 6,4 мМ ТХ (белые кружки), проведены аппроксимирующие прямые 1 (сплошная линия) и 2 (пунктирная линия) соответственно



Рис. 6. ТХ уменьшает стационарную концентрацию интермедиата F_1 -607 в псевдокаталазном цикле ЦО. a – Полоса Соре, δ – видимая область. Концентрационная зависимость амплитуды спектральных ответов, возникающих при титровании ЦО (1,3 мкМ) возрастающими концентрациями H_2O_2 . Среда опыта: базовая среда + 50 мМ KCl, pH 8,1, 1 мМ ДМ. Титрование проводили в среде без ТХ (контроль – кривая I, белые кружки) либо в присутствии 6,4 мМ ТХ (кривая 2, черные кружки). Изменение амплитуд возникающих разностных спектров относительно окисленной ЦО регистрировали по разности поглощения при 435–412 нм, панель a, либо при 607–630 нм, панель δ . Добавление H_2O_2 производили с интервалом в 6 мин, спектры записывали через 3 мин после очередного добавления. a – TX не влияет на стабильность интермедиата F_1 -607, полученного путем пропускания СО через аэробный раствор ЦО. Показан разностный спектр образца (относительно окисленной ЦО), возникающий после 2 мин обработки СО. Среда опыта: базовая среда + 50 мМ KCl, pH 8,1; 1 мМ ДМ; 0,1 мМ феррицианид; каталаза. Эксперимент проводили в закрытой кювете. Спектр I (пунктирная линия) – контроль, спектры 2 (сплошная линия) и 3 (чередование пунктира с точками) – среда опыта содержала 16 мМ ТХ. Спектры I и 2 записаны через 5 мин, а спектр 3 – через 25 мин после обработки СО

взаимодействия ЦО с перекисью водорода, а альтернативным методом, по Николсу (см. «Методы исследования»). Форма ЦО, химически идентичная F_1 -607, образуется при аэробном взаимодействии окисленного фермента с окисью углерода [28]. Как видно из приведенных на рис. 6, *в* разностных спектров (ЦО после обработки СО против окисленного образца), в этом случае ТХ практически не влияет ни на эффективность образования формы F_1 -607, ни на ее стабильность. Форма F_1 -607 в присутствии 16 мМ ТХ стабильна, по крайней мере, 25 мин (сравн. спектры образца, записанные через 5 и через 25 мин после обработки CO, с контролем — соответственно, 2, 3 и 1). Это время соответствует стандартной продолжительности проведения полных титрований ЦО перекисью водорода, данные которых показаны на рис. 6, *а* и *б*. Таким образом, более вероятно, что действие TX на стационарную концентрацию интермедиата F_1 -607 в ходе титрования ЦО перекисью водорода объясняется изменением



Рис. 7. Сравнение действия ТХ на оксидазную и парциальные активности ЦО. Все измерения проводили при рН 7,5 в присутствии 1 мМ ДМ. Ферментативные активности выражены в % от соответствующего контрольного значения, полученного в отсутствие ТХ. Кривая *1*: пероксидазную активность (черные квадраты) определяли спектрофотометрически по перекисному окислению *о*-дианизидина. Условия: ЦО – 0,5 мкМ, *о*-дианизидин – 0,2 мМ, $H_2O_2 - 4$ мМ. Кривая *2*: оксидазную активность (черные квадраты) измеряли, как на рис. 1, *б*. Кривая *3*: генерацию супероксида (пунктирная линия, белые треугольники) измеряли спектрофотометрически, по восстановлению красителя WST-1. Условия: ЦО – 1 мкМ, WST-1 – 0,1 мМ, $H_2O_2 - 2$ мМ

скорости реакции на некоторых стадиях псевдокаталазного цикла, представленного на схеме 2.

Действие ТХ на пероксидазную активность. Для того, чтобы определить, какие из стадий, входящих в полный каталитический цикл ЦО, являются мишенью действия ТХ, мы протестировали чувствительность к ингибированию парциальных активностей фермента.

ЦО катализирует двухэлектронное восстановление до воды связанной с окисленным биядерным центром молекулы перекиси, что представляет собой «пероксидазную» часть полного каталитического цикла фермента [34]. Однако регистрировать такую активность непросто, поскольку в аэробных условиях перекись, как конечный акцептор, проигрывает кислороду, и пероксидазная реакция составляет лишь малую долю общего числа оборотов фермента. Для измерения пероксидазной активности ЦО использовались высокопотенциальные доноры: редокс-буфер ферро/феррицианид (с редокс-потенциалом около +400 мВ) вместе с каталитическим количеством цитохрома с, служащего непосредственным донором электронов для ЦО, либо классический субстрат пероксидаз – о-дианизидин [25, 34]. При редокс-потенциале буфера выше +400 мВ оксидазная активность ЦО практически отсутствует, и реакция включается добавлением в качестве конечного акцептора H_2O_2 , что позволяет регистрировать пероксидазную активность ЦО в аэробных условиях [34].

Влияние ТХ на пероксидазную активность ЦО показано на рис. 7, кривая *1*. Было обнаружено, что в условиях двукратного ингибирования оксидазной реакции ТХ почти не оказывает действия на пероксидазную активность ЦО (сравн. кривые 2 и 1 на рис. 7). В милимолярном диапазоне концентраций ТХ пероксидазная реакция проявляет частичную чувствительность к ингибированию: 80% активности титруется с $K_{i(app)} = 1,5$ мМ, что втрое превышает значение $K_{i(app)}$ для оксидазной реакции в тех же условиях (1 мМ ДМ), а 20% активности остается устойчиво к действию ингибитора.

Ингибирование образования O_2^{-} . Схема псевдокаталазного цикла ЦО предсказывает образование супероксидных радикалов при взаимодействии ЦО с H_2O_2 на стадии одноэлектронного восстановления F_1 -607, а также, возможно, и при восстановлении интермедиата F_{II} -580 (см. схему 2, стадии II и III). Появление супероксидных радикалов в ходе реакции окисленной ЦО с избытком H_2O_2 было показано нами экспериментально [33, 36] и подтверждено недавно в работе Jancura et al. [37]. Эта реакция может рассматриваться как еще одна парциальная окислительно-восстановительная активность фермента.

Данные по влиянию TX на образование супероксидных радикалов при взаимодействии ЦО с избытком H_2O_2 представлены на рис. 7, кривая 3. За образованием радикалов O_2^{-} следили по восстановлению окрашенных солей тетразолия, которое полностью подавлялось супероксиддисмутазой, цианидом, а также тепловой инактивацией ЦО (данные не приведены). Было найдено, что образование радикалов O_2^{-} столь же чувствительно к TX, как и оксидазная реакция. Как показано на рис. 7, концентрационные зависимости двух активностей (кривые 3 и 2 соответственно) практически совпадают и характеризуются значением $K_{i(арр)} \approx 0,5$ мМ.

Влияние ТХ на каталазную активность. Еще одной частной реакцией ЦО является каталазная активность: способность окисленного фермента разлагать перекись водорода с выделением кислорода [6, 38]. Несмотря на активное изучение этого вопроса [27, 37, 39], механизм реакции окончательно не установлен. Известно, однако, что процесс происходит при участии окисленного биядерного центра. Как обсуждается в работах Konstantinov et al. [33, 39], каталазная активность, как и генерация $O_2^{\bullet-}$, может быть связана с функционированием фермента в режиме псевдокаталазного цикла и осуществляться на стадиях II и III (схема 2).



Рис. 8. Влияние ТХ на каталазную активность ЦО. Каталазную активность ЦО регистрировали по выделению кислорода. Среда опыта («каталазная среда», рН 7,2, 1 мМ ДМ) содержала 12 мМ H_2O_2 . Реакцию запускали добавлением 1 мкМ ЦО (показано стрелкой). Кривая 1 -контроль, кривая 2 -среда опыта содержала также 6,4 мМ ТХ

Каталазную активность окисленной ЦО определяли в присутствии H_2O_2 по скорости повышения в среде концентрации O_2 (рис. 8). В контрольном опыте скорость реакции составляет ~10 мкМ O_2 за 1 мин (рис. 8, кривая *I*), а в присутствии TX она уменьшается до 6 мкМ O_2 за 1 мин (рис. 8, кривая *2*). Аналогичные результаты получены при добавлении TX по ходу реакции (данные не приведены). Таким образом, 6,4 мМ TX ингибирует каталазную активность ЦО на 40%, т.е. примерно вдвое менее эффективно, чем оксидазную (сравн. с ингибированием оксидазной активности в тех же условиях на 91% – см. рис. 1, δ , кривая *I* и рис. 7, кривая *2*).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Целью нашего исследования была попытка понять механизм действия тритона на активность солюбилизированной ЦО из митохондрий сердца быка. На основании полученных результатов мы прежде всего смогли отвергнуть несколько перечисленных ниже возможностей.

• Ингибирование оксидазной активности ТХ не направлено на взаимодействие ЦО и цитохрома *с* – это следует из того, что эффект наблюдается при использовании альтернативного дыхательного субстрата, ТМФД (рис. 3). Отметим также, что, по данным работ Rosevear et al. [9], Sinjorgo et al. [13] и Mahapatro и Robinson [14], ТХ не изменяет скорости связывания цитохрома *с* с солюбилизированным ферментом.

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

• Действие ТХ не связано с переходом ЦО в «медленную» форму. Об этом свидетельствует тот факт, что ТХ не влияет на скорость взаимодействия окисленной ЦО с КСN в широком диапазоне концентраций лиганда (рис. 5). Замедление этой реакции является основным признаком перехода фермента в «медленную» форму. Можно заключить, что ТХ не только не вызывает подобный переход, но вообще не влияет на соотношение двух форм в препарате.

• ТХ используется как агент, вызывающий переход ЦО из димерной формы в мономерную, и можно было бы думать, что наблюдаемые в нашей работе эффекты имеют к этому отношение. Однако методики, применяемые для мономеризации, предполагают условия весьма далекие от использованных в нашей работе. В частности, концентрация ТХ составляет в них от 80 мМ [17] до 800 мМ [18]. Как отмечается в работах Robinson и Capaldi [16] и Sadoski et al. [40], при концентрациях тритона в диапазоне 0,1–1% (соответствует 1,6–16 мМ) фермент полностью остается в димерной форме. Это соответствует условиям всех наших экспериментов.

Мы предполагаем, что исследуемые нами эффекты тритона на ЦО имеют прямое отношение к механизмам регуляции фермента. В серии работ лаборатории Ferguson-Miller [20, 41-44] в трехмерной структуре ЦО из Rhodobacter sphaeroides описана гидрофобная площадка, способная связывать относительно крупные амфипатические молекулы. Сравнительный анализ структуры ЦО из сердца быка обнаруживает аналогичный участок и у фермента из митохондрий [42, 45]. Сайт получил название центра связывания желчных кислот, поскольку на некоторых структурах в нем видна связанная молекула детергента, использовавшегося при кристаллизации: дезоксихолат ШО в ИЗ R. sphaeroides и холат в ЦО из сердца быка. Согласно результатам компьютерного анализа структуры, ЦСЖК обладает сродством к целому ряду физиологически активных соединений амфипатической природы (производным желчных пигментов, ретиноевой кислоте, стероидам, тиреоидному гормону, нуклеотидам и др.) [43]. Для некоторых из них было показано модулирующее (ингибирующее или активирующее) влияние на активность ЦО. ЦСЖК находится на границе субъединиц I и II у внутренней стороны мембраны, вблизи входа в протонный канал К. В непосредственной близости от него на структуре ЦО из R. sphaeroides просматривается связанная молекула децилмальтозида: ее алкильный «хвост» расположен в гидрофобной впадине на границе субъединиц I и II, а мальтозидная группа, как отмечают авторы, способна достигать места связывания типичных амфипатических лигандов ЦСЖК, конкурируя с ними за взаимодействие с ферментом [20, 42]. На структуре фермента из митохондрий примерно в этом же месте обнаружена молекула связанного фосфолипида [20].

Нам удалось количественно охарактеризовать влияние тритона и додецилмальтозида на активность солюбилизированной ЦО. Как выяснилось (рис. 1, 2), додецилмальтозид предотвращает и обращает ингибирование фермента тритоном, конкурируя с ним за место связывания в соотношении 1/1. Неполное восстановление активности в присутствии ДМ после обработки ЦО тритоном можно объяснить, по крайней мере, частично, ингибирующим действием самого ДМ, добавленного в высокой концентрации (рис. 2, б). Важно отметить, что мы наблюдали модификацию эффекта тритона на оксидазную активность в присутствии не только ДМ, но и ионного детергента холата (неопубликованные данные). В этом случае имело место не ослабление ингибирования, а лишь замедление его развития. Так, ингибирующий эффект 1 мМ ТХ на фоне 3,2 мМ холата развивается в течение 40-60 с (сравн. с рис. 1, *a*, кривая *1*, где ингибирующее действие 1 мМ ТХ на фоне 1 мМ ДМ развивается за время смешивания).

Конкурентные отношения между ТХ и ДМ, а также между ТХ и холатом указывают на то, что место связывания тритона совпадает или перекрывается с ЦСЖК. Действительно, в этом случае мальтозидная группа ДМ препятствовала бы связыванию ТХ (см. выше), уменьшая его эффективное сродство к ферменту и величину $K_{i(app)}$. Сродство к ЦСЖК у тритона, по-видимому, существенно выше, чем у холата, поскольку в присутствии обоих лигандов ингибирующее действие ТХ развивается полностью, хотя и с задержкой.

В недавней работе Oleynikov et al. [46] мы впервые продемонстрировали, что ингибиторами ЦО из сердца быка могут быть стероидные гормоны. При этом, как и в случае с ТХ, додецилмальтозид ослаблял действие ингибитора, конкурируя с ним за связывание с ферментом в соотношении 1/1. Сродство к ЦО самого додецилмальтозида, полученное в настоящей работе (1,2 мМ, рис. 1, θ), весьма близко к оценкам, сделанным на основании исследования его конкуренции с эстрадиолом (1,47 мМ) и с тестостероном (1,3 мМ). Интересно отметить, что очень близкими оказались также значения истинной константы ингибирования, полученные для TX (0,3 мМ, рис. 1, θ) и для эстрадиола (0,37 мМ).

Сходство параметров ингибирования может указывать на определенное структурное сход-

ство ингибиторов – ТХ и эстрадиола. Несмотря на очевидную разницу в химическом строении молекул, это сходство может проявляться при пространственном взаимодействии лиганда с сайтом связывания. Гидрофобный фрагмент молекулы тритона представляет собой группу 4трет-октилфенола – соединения, известного своей способностью связываться с рецепторами эстрогенов и имитировать их действие [47, 48]. Можно предположить, что эта же часть молекулы ТХ взаимодействует с ЦСЖК, заменяя собой природный лиганд стероидной природы. Что касается додецилмальтозида, то он часто рассматривается, как структурный аналог фосфолипида [49]. Таким образом, описанное нами в этой работе влияние додецилмальтозида на связывание тритона с ЦО может имитировать естественную ситуацию, при которой эндогенный фосфолипид, связываясь вблизи сайта ЦСЖК, контролирует величину сродства ЦСЖК к природным амфипатическим лигандам (например, стероидам).

В цепочке переноса электронов между кофакторами ЦО (схема 1) тритон, судя по нашим данным, ингибирует перенос электрона с гема а на гем a_3 . Об этом свидетельствует повышение уровня восстановления гема а в ферменте, работающем в стационарных условиях (рис. 3, a), а также уменьшение скорости восстановления гема a_3 при наступлении анаэробиоза (рис. 3, δ). К такому же выводу пришли ранее Antalik et al. [21], изучая кинетику восстановления гема a_3 в присутствии тритона Х-100 методом быстрого смешивания. Замедление восстановления гема а₃ в опытах с использованием быстрого смешивания мы наблюдали и в случае взаимодействия ЦО с эстрадиолом [46]. Примечательно, что именно данная стадия внутримолекулярного транспорта электрона блокируется в ЦО из *R. sphaeroides* мутациями по ключевым остаткам протонного К-канала, в частности К362 и Е101 [50, 51]. На основании этого совпадения можно предположить, что действие тритона влияет на функционирование К-канала.

Другая характерная особенность ингибирования, вызываемого мутациями по остаткам Кканала, состоит в том, что пероксидазная активность ЦО, в отличие от оксидазной, остается незатронутой [50, 51]. Это объясняется тем, что в пероксидазной фазе каталитического цикла перенос протонов в биядерный центр осуществляется не по К-, а по D-каналу [34, 50]. Как показано в нашей работе, пероксидазная активность окисленной ЦО проявляет значительную устойчивость к тритону в тех концентрациях, которые вызывают практически полное ингибирование оксидазной реакции (рис. 7, кривые 1 и 2). Это

наблюдение служит вторым серьезным аргументом в пользу того, что ингибирующее действие ТХ на оксидазную активность ЦО связано с нарушением работы протонного К-канала.

Косвенным свидетельством в пользу той же гипотезы можно считать и индуцируемый ТХ спектральный сдвиг полосы поглощения гема a_3 . Канал К доставляет протоны непосредственно в биядерный центр, и нарушение его проводимости под действием ТХ может повлиять на окружение высокоспинового гема, изменив распределение электронной плотности на лигандах и т.п.

Предположения о взаимодействии тритона с ЦСЖК и о его влиянии на К-канал хорошо согласуются друг с другом. В работах лаборатории Ferguson-Miller [42] отмечается близость ЦСЖК ко входу в К-канал и высказывается гипотеза о том, что некоторые амфипатические лиганды ЦСЖК могут нарушать перенос протонов в биядерный центр. Авторы предполагают, что причиной нарушения может быть как влияние на структуру водородных связей и ограничение подвижности молекул воды в канале, так и блокирование конформационных изменений в районе трансмембранной спирали VIII, сопряженных с восстановлением фермента и необходимых для быстрого проведения протонов к гему *а*₃. Мутация по остатку Glu101 во второй субъединице ЦО из R. sphaeroides (считающемуся входным пунктом для протонов, поступающих в канал К [51]) оказывает на эффекты, вызываемые лигандами ЦСЖК, серьезное модулирующее влияние [44]. Сходство действия тритона с мутациями по остаткам К-канала впервые было отмечено в работе Antalik et al. [21], причем там же высказано предположение о связывании ТХ с ЦО в месте связывания холата. Любопытно, что авторы фактически приводят и данные об устойчивости к ингибированию тритоном пероксидазной активности ЦО, однако интерпретируют их как активацию перекисью оксидазной реакции с ферроцианидом в качестве донора. Мы предполагаем, что в действительности речь идет здесь о восстановлении H₂O₂ за счет окисления ферментом высокопотенциального донора (ферроцианида в присутствии значительного количества феррицианида).

Большой интерес представляет вопрос о месте действия TX в каталитическом цикле фермента. В работе Sadoski et al. [40] утверждается, что в присутствии тритона существенно ускоряется переход F_{II} -580 \rightarrow Ox, что на схеме 2 соответствует реакции III. Однако этот результат получен при высокой (5%, т.е. 80 мМ) концентрации TX, вызывающей переход фермента в мономерную форму. При концентрации детергента, не-

достаточной для мономеризации (1%, т.е. 16 мМ ТХ), эффект ускорения практически отсутствует, а под действием 0,1% (1,6 мМ) ТХ процесс, напротив, замедляется (см. Table 1 в работе Sadoski et al. [40]). В опытах по определению влияния TX на распределение стационарных концентраций интермедиатов F₁-607 и F_{II}-580 в процессе титрования окисленного фермента H₂O₂ мы наблюдали ускорение исчезновения формы F₁-607 (с переходом биядерного центра в форму F_{II}-580) в присутствии 6,4 мМ ТХ (рис. 6, а и б). Поскольку контрольный опыт показал, что ТХ не дестабилизирует интермедиат F_1 -607 химически (рис. 6, *в*), то эффект, наблюдаемый при титровании ЦО перекисью, можно объяснить лишь тем, что в условиях псевдокаталазного цикла (схема 2) тритон ускоряет реакцию II (превращение F_I -607 \rightarrow F_{II} -580). С другой стороны, ингибирование тритоном образования супероксида в условиях псевдокаталазного цикла (рис. 7, кривая 3) указывает на замедление реакций II и/или III (схема 2). Наконец, каталазная активность ЦО, предположительно в равной степени сопряженная с реакциями II и III [33, 39], оказалась в два раза более устойчивой к действию тритона, чем оксидазная (рис. 8).

Обобщая имеющиеся данные по влиянию тритона на взаимодействие ЦО с перекисью, можно предположить, что наиболее вероятной мишенью действия TX является переход F_{II}-580→Ox (стадия III псевдокаталазного цикла), что согласуется с работой Sadoski et al. [40]. В наших экспериментах торможением стадии III могло бы объясняться ингибирование тритоном генерации супероксида. Наблюдаемое в эксперименте подавление каталазной активности на 40% также качественно согласуется с ингибированием стадии III на 90% при сохранении или некотором увеличении скорости реакции на стадии II. Ингибирование тритоном превращения F_{II}-580→Ох происходит, очевидно, не только в псевдокаталазном, но и в полном каталитическом цикле ЦО и может играть важную роль в механизме подавления активности фермента.

Таким образом, наши исследования взаимодействия тритона X-100 с солюбилизированной митохондриальной ЦО

(1) обнаружили наличие конкуренции в соотношении 1/1 между тритоном X-100 и додецилмальтозидом, которая, по-видимому, имитирует естественную ситуацию регуляции активности фермента с участием лиганда ЦСЖК (например, стероидного гормона) и молекулы эндогенного фосфолипида, контролирующей эффективное сродство к лиганду;

(2) выявили у фермента, ингибированного тритоном, характерные признаки нарушения

работы протонного канала К (замедление реакции переноса электрона с гема a на гем a_3 и сохранение пероксидазной активности при полном подавлении оксидазной);

(3) на основании данных о взаимодействии фермента с H_2O_2 позволили сделать предположение о месте действия тритона в каталитическом цикле (ингибирование превращения интермедиатов F_{II} -580 \rightarrow Ox).

Полученные результаты представляются весьма существенными для понимания механизма эндогенной регуляции активности ЦО. Работа имеет и практическую ценность, поскольку тритон может оказаться удобным

 Wikström, M., and Sharma, V. (2018) Proton pumping by cytochrome c oxidase – a 40 year anniversary, *Biochim. Bbiophys. Acta (Bioenerg.)*, 1859, 692-698, doi: 10.1016/

- j.bbabio.2018.03.009.
 Siletsky, S., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, 1817, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabio.2011. 08.003.
- Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, 115, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
- Rich, P. R. (2017) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, 45, 813-829, doi: 10.1042/BST20160139.
- Sun, F. F., Prezbindowski, K. G., Crane, F. L., and Jacobs, E. E. (1968) Physical state of cytochrome oxidase. Relationship between membrane formation and ionic strength, *Biochim. Biophys. Acta*, 153, 804-818, doi: 10.1016/0005-2728(68)90008-x.
- Lemberg, M. R. (1969) Cytochrome oxidase, *Physiol. Rev.*, 49, 48-121, doi: 10.1152/physrev.1969.49.1.48.
- Van Buuren, K. J., and Van Gelder, B. F. (1974) Biochemical and biophysical studies on cytochrome c oxidase. XIII. Effect of cholate on the enzymic activity, *Biochim. Biophys. Acta*, 333, 209-217, doi: 10.1016/0005-2728(74)90005-x.
- 8. Soulimane, T, and Buse, G. (1995) Integral cytochrome-*c* oxidase. Preparation and progress towards a three-dimensional crystallization, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 588-595, doi: 10.1111/j.1432-1033.1995.tb20429.x.
- 9. Rosevear, P., Van Aken, T., Baxter, J., and Ferguson-Miller, S. (1980) Alkyl glycoside detergents: a simpler synthesis and their effects on kinetic and physical properties of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **19**, 4108-4115, doi: 10.1021/bi00558a032.
- Soltysiak, D., and Kaniuga, Z. (1970) The effect of triton X-100 on the respiratory chain enzymes of a heart-muscle preparation, *Eur. J. Biochem.*, 14, 70-74, doi: 10.1111/ j.1432-1033.1970.tb00262.x.
- Teller, J. K., Ziemnicki, K., and Obuchowicz, L. (1980) The effect of triton X-100 on cytochrome oxidase activity in carp, frog and rat liver mitochondria, *Comp. Biochem. Physiol.*, **65B**, 747-750, doi: 10.1016/0305-0491(80)90192-3.
- 12. Barbero, M. C., Valpuesta, J. M., Rial, E., Gurtubay, J. I., Goñi, F. M., and Macarulla, J. M. (1984) Effect of the nonionic detergent Triton X-100 on mitochondrial succi-

инструментом для изучения К-канала митохондриальной ЦО, отчасти заменяющим невозможный в данном случае мутагенез.

Финансирование. Эта работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 19-14-00063).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

nate-oxidizing enzymes, *Arch. Biochem. Bbiophys.*, **228**, 560-568, doi: 10.1016/0003-9861(84)90023-7.

- Sinjorgo, K. M., Durak, I., Dekker, H. L., Edel, C. M., Bieleman, A. H., et al. (1987) The effect of detergents on bovine cytochrome *c* oxidase: a kinetic approach, *Biochim. Biophys. Acta*, **893**, 241-250, doi: 10.1016/0005-2728(87)90045-4.
- Mahapatro, S. N., and Robinson, N. C. (1990) Effect of changing the detergent bound to bovine cytochrome *c* oxidase upon its individual electron-transfer steps, *Biochemistry*, 29, 764-770, doi: 10.1021/bi00455a025.
- Tarasev, M., and Hill, B. C. (2002) Detergent modulation of electron and proton transfer reactions in bovine cytochrome c oxidase, *Arch. Biochem. Bbiophys.*, 400, 162-170, doi: 10.1016/S0003-9861(02)00011-5.
- Robinson, N. C., and Capaldi, R. A. (1977) Interaction of detergents with cytochrome c oxidase, *Biochemistry*, 16, 375-381, doi: 10.1021/bi00622a006.
- Georgevich, G., Darley-Usmar, V. M., Malatesta, F., and Capaldi, R. A. (1983) Electron transfer in monomeric forms of beef and shark heart cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, 22, 1317-1322, doi: 10.1021/bi00275a001.
- Robinson, N. C., and Talbert, L. (1986) Triton X-100 induced dissociation of beef heart cytochrome *c* oxidase into monomers, *Biochemistry*, 25, 2328-2335, doi: 10.1021/bi00357a005.
- Henderson, R., Capaldi, R. A., and Leigh, J. S. (1977) Arrangement of cytochrome oxidase molecules in twodimensional vesicle crystals, *J. Mol. Biol.*, **112**, 631-648, doi: 10.1016/s0022-2836(77)80167-8.
- Qin, L., Mills, D. A., Buhrow, L., Hiser, C., and Ferguson-Miller, S. A. (2008) Conserved steroid binding site in cytochrome c oxidase, *Biochemistry*, 47, 9931-9933, doi: 10.1021/bi8013483.
- Antalik, M., Jancura, D., Palmer, G., and Fabian, M. (2005) A role for the protein in internal electron transfer to the catalytic center of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, 44, 14881-14889, doi: 10.1021/bi050824z.
- Bergmeyer, H. U., Gawehn, K., and Grassl, M. (1970) in Methoden der Enzymatischen Analyze (Bergmeyer, H. U., ed.) Verlag Chemie, Weinheim, p. 440.
- 23. Fowler, L. R., Richardson, S. H., and Hatefi, Y. (1962) A rapid method for the preparation of highly purified cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **64**, 170-173, doi: 10.1016/0006-3002(62)90770-9.
- 24. Vygodina, T. V., Kirichenko, A., and Konstantinov, A. A. (2014) Cation binding site of cytochrome c oxidase:

progress report, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1188-1195, doi: 10.1016/j.bbabio.2014.02.025.

- Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (2007) Peroxidase activity of mitochondrial cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1056-1064, doi: 10.1134/ s0006297907100045.
- Bielski, B. H., Shiue, G. G., and Bajuk, S. (1980) Reduction of nitro blue tetrazolium by CO₂- and O₂-radicals, *J. Phys. Chem.*, 84, 830-833, doi: 10.1021/ j100445a006.
- Hilbers, F., von der Hocht, I., Ludwig, B., and Michel, H. (2013) True wild type and recombinant wild type cytochrome c oxidase from *Paracoccus denitrificans* show a 20-fold difference in their catalase activity, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 319-327, doi: 10.1016/j.bbabio. 2012.10.008.
- Nicholls, P., and Chanady, G. A. (1981) Interactions of cytochrome *aa*₃ with oxygen and carbon monoxide. The role of the 607 nm complex, *Biochim. Biophys. Acta*, 634, 256-265, doi: 10.1016/0005-2728(81)90144-4.
- 29. Vanneste, W. H. (1966) The stoichiometry and absorption spectra of components *a* and *a*-3 in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **5**, 838-848, doi: 10.1021/bi00867a005.
- Vygodina, T. V., Dyuba, A. V., and Konstantinov, A. A. (2012) Effect of calcium ions on electron transfer between hemes *a* and *a*₃ in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry* (*Moscow*), 77, 901-909, doi: 10.1134/S0006297912080111.
- Moody, A. J. (1996) "As prepared" forms of fully oxidised haem/Cu terminal oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1276**, 6-20, doi: 10.1016/0005-2728(96)00035-7.
- Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1988) H₂O₂induced conversion of cytochrome *c* oxidase peroxy complex to oxoferryl state, *Ann. NY Acad. Sci.*, **550**, 124-138, doi: 10.1111/j.1749-6632.1988.tb35329.x.
- 33. Konstantinov, A. A., Capitanio, N., Vygodina, T. V., and Papa, S. (1992) pH changes associated with cytochrome *c* oxidase reaction with H₂O₂. Protonation state of the peroxy and oxoferryl intermediates, *FEBS Lett.*, **312**, 71-74, doi: 10.1016/0014-5793(92)81412-f.
- Konstantinov, A. (1998) Cytochrome *c* oxidase as a protonpumping peroxidase: reaction cycle and electrogenic mechanism, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 121-130, doi: 10.1023/a:1020571930850.
- 35. Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion, *FEBS Lett.*, **586**, 630-639, doi: 10.1016/j.febslet.2011.08.037.
- Ksenzenko, M. Yu., Vygodina, T. V., Berka, V., Ruuge, E. K., and Konstantinov, A. A. (1992) Cytochrome oxidase-catalyzed superoxide generation from hydrogen peroxide, *FEBS Lett.*, **297**, 63-66, doi: 10.1016/0014-5793(92)80328-e.
- Jancura, D., Stanicova, J., Palmer, G., and Fabian, M. (2014) How hydrogen peroxide is metabolized by oxidized cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **53**, 3564-3575, doi: 10.1021/bi401078b.
- Bickar, D., Bonaventura, J., and Bonaventura, C. (1982) Cytochrome *c* oxidase binding of hydrogen peroxide, *Biochemistry*, **21**, 2661-2666, doi: 10.1021/bi00540a013.
- Bolshakov, I. A., Vygodina, T. V., Gennis, R., Karyakin, A. A., and Konstantinov, A. A. (2010) Catalase activity of cytochrome *c* oxidase assayed with hydrogen peroxide-sen-

sitive electrode microsensor, *Biochemistry (Moscow)*, **75**, 1352-1360, doi: 10.1134/s0006297910110064.

- Sadoski, R. C., Zaslavsky, D., Gennis, R. B., Durham, B., and Millett, F. (2001) Exposure of bovine cytochrome *c* oxidase to high triton X-100 or to alkaline conditions causes a dramatic change in the rate of reduction of compound F, *J. Biol. Chem.*, **276**, 33616-33620, doi: 10.1074/jbc. M103640200.
- 41. Ferguson-Miller, S., Hiser, C., and Liu, J. (2012) Gating and regulation of the cytochrome *c* oxidase proton pump, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1817**, 489-494, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.11.018.
- Hiser, C., Buhrow, L., Liu, J., Kuhn, L., and Ferguson-Miller, S. (2013) A conserved amphipathic ligand binding region influences K-path-dependent activity of cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **52**, 1385-1396, doi: 10.1021/ bi3014505.
- Buhrow, L., Hiser, C., van Voorst, J. R., Ferguson-Miller, S., and Kuhn, L. A. (2013) Computational prediction and *in vitro* analysis of potential physiological ligands of the bile acid binding site in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, 52, 6995-7006, doi: 10.1021/bi400674h.
- 44. Hiser, C., Liu, J., and Ferguson-Miller, S. (2018) The Kpath entrance in cytochrome *c* oxidase is defined by mutation of E101 and controlled by an adjacent ligand binding domain, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, **1859**, 725-733, doi: 10.1016/j.bbabio.2018.03.017.
- Yoshikawa, S., Muramoto, K., Shinzawa-Itoh, K., and Mochizuki, M. (2012) Structural studies on bovine heart cytochrome c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta (Bioenerg.)*, 1817, 579-589, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.12.012.
- Oleynikov, I. P., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (2020) Interaction of cytochrome *c* oxidase with steroid hormones, *Cells*, 9, 2211, doi: 10.3390/cells9102211.
- 47. Madsen, L. L., Korsgaard, B., and Bjerregaard, P. (2003) Estrogenic effects in flounder Platichthys flesus orally exposed to 4-tert-octylphenol, *Aquatic Toxicol.*, **64**, 393-405, doi: 10.1016/s0166-445x(03)00106-1.
- Kennedy, R. H., Pelletier, J. H., Tupper, E. J., Hutchinson, L. M., and Gosse, J. A. (2012) Estrogen mimetic 4-tertoctylphenol enhances IgE-mediated degranulation of RBL-2H3 mast cells, *J. Toxicol. Envir. Health.*, **75**, 1451-1455, doi: 10.1080/15287394.2012.722184.
- Qin, L., Hiser, C., Mulichak, A., Garavito, R. M., and Ferguson-Miller, S. (2006) Identification of conserved lipid/detergent-binding sites in a high-resolution structure of the membrane protein cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103, 16117-16122, doi: 10.1073/pnas. 0606149103.
- Vygodina, T. V., Pecoraro, C., Mitchell, D., Gennis, R., and Konstantinov, A. A. (1998) Mechanism of inhibition of electron transfer by amino acid replacement K362M in a proton channel of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **37**, 3053-3061, doi: 10.1021/ bi971876u.
- Tomson, F. L., Morgan, J. E., Gu, G., Barquera, B., Vygodina, T. V., and Gennis, R. B. (2003) Substitutions for glutamate 101 in subunit II of cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* result in blocking the proton-conducting K-channel, *Biochemistry*, **42**, 1711-1717, doi: 10.1021/bi026750y.

MECHANISM OF INHIBITION OF CYTOCHROME *c* OXIDASE BY TRITON X-100

I. P. Oleynikov^{1,2}, N. V. Azarkina^{2*}, T. V. Vygodina², and A. A. Konstantinov²

¹ Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia ² Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119992 Moscow, Russia; E-mail: azarkina@yahoo.com

It is known that Triton X-100 (TX) reversibly inhibits activity of cytochrome *c* oxidase (CcO). The mechanism of inhibition is analyzed in this work. The action of TX is not directed to the reaction of CcO with cytochrome *c*, does not cause transition of the enzyme to the "slow" form, and is not associated with monomerization of the enzyme complex. TX completely suppresses oxygen reduction by CcO, but inhibition is prevented and partially reversed by dode-cyl- β -D-maltoside (DDM), a detergent used to maintain CcO in solution. A 1/1 stoichiometry competition is shown between DDM and TX for binding to CcO, with $K_i = 0.3$ mM and affinity of DDM for the enzyme of 1.2 mM. TX interaction with the oxidized enzyme induces spectral response with maximum at 421 nm and $[TX]_{1/2} = 0.28$ mM, presumably associated with heme a_3 . When CcO interacts with excess of H₂O₂ TX affects equilibrium of the oxygen intermediates of the catalytic center accelerating the F₁-607 \rightarrow F₁₁-580 transition, inhibits generation of O₂⁻⁻ by the enzyme, and, to a lesser extent, suppresses the catalase partial activity. The observed effects can be explained by inhibition of the conversion of the intermediate F₁₁-580 to the free oxidized state during the catalytic cycle. TX suppresses is intraprotein electron transfer between hemes *a* and a_3 during enzyme turnover. Partial peroxidase activity of CcO remains relatively resistant to TX under conditions that block oxidase reaction effectively. These features indicate an impairment of the K proton channel conductivity. We suggest that TX interacts with amphipathic regulators of CcO [Buhrow et al. (2013) *Biochemistry*, **52**, 6995-7006]. Apparently, TX mimics the physiological ligand of BABS, whereas the DDM molecule mimics an endogenous phospholipid bound at the edge of BABS that controls effective affinity for the ligand.

Keywords: cytochrome c oxidase, Triton X-100, regulation, K-cnannel, amphipathic ligands
УДК 577.121.7

СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ АНИОНОВ НА ЩЕЛОЧНОЕ СОСТОЯНИЕ ЦИТОХРОМА *с*

© 2021 Е. Седлак^{1,2}, Т. Кожар², Р. Вархач¹, А. Мусатов³, Н. Томашкова^{1*}

 ¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia; e-mail: natasa.tomaskova@upjs.sk
 ² Centre for Interdisciplinary Biosciences, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia
 ³ Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, 04001 Košice, Slovakia

> Поступила в редакцию 28.08.2020 После доработки 10.11.2020 Принята к публикации 10.11.2020

Изучено специфическое влияние анионов на структуру и термостабильность, а также на пероксидазную активность нативного (состояние III) и щелочного (состояние IV) цитохрома с (суt с) с помощью методов УФабсорбционной спектроскопии, собственной флуоресценции триптофана и кругового дихроизма. Термическая и изотермическая денатурация, контролируемая, соответственно, по флуоресценции триптофана и методом кругового дихроизма, предполагают более низкую стабильность cyt с в состоянии IV по сравнению с состоянием III. Значения рК, шелочной изомеризации суt с зависят от присутствующих солей, в соответствии с эффектом Хофмейстера на стабильность белка, т.е. космотропные анионы увеличивают, а хаотропные анионы уменьшают его значение. Пероксидазная активность суt с в состоянии III, измеренная путём окисления гваякола, показывает четкую зависимость от положения солей в ряду Хофмейстера, в то время как cyt с в щелочном состоянии не проявляет пероксидазной активности независимо от типа анионов, присутствующих в растворе. Щелочная изомеризация суt c в присутствии 8 М мочевины, измеренная по флуоресценции Trp59, предполагает существование высокоаффинного не природного для гемового железа лиганда даже при частично денатурированной конформации белка. Конформация сус с в щелочном состоянии в 8 М мочевине заметно модулируется специфическим эффектом анионов. Основываясь на снижении флуоресценции Тгр59 при титровании до щелочного значения рН в 8 М мочевине и используя метод молекулярной динамики, мы предполагаем, что Lys79-конформер является, скорее всего, доминирующим щелочным конформером суt с. Высокое сродство шестого лиганда к гемовому железу, вероятно, является причиной отсутствия пероксидазной активности у суt с в щелочной среде.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: щелочная изомеризация, анионы Хофмейстера, псевдо-пероксидазная активность. **DOI:** 10.31857/S0320972521010061

введение

Цитохром c (суt c) – это многофункциональный гемопротеин, расположенный преимущественно на внешней стороне внутренней митохондриальной мембраны, где он выполняет свою функциональную роль в качестве мобильного переносчика электронов между комплексом III и комплексом IV в дыхательной цепи. Кроме того, суt c способен катализировать пероксидазо-подобные реакции [1], может функционировать как ловушка супероксида [2–4] и участвовать в инициации апоптоза после выхода в цитоплазму [5–7]. Более того, во внемитохондриальном пространстве суt c был идентифици-

рован как партнер взаимодействия для более чем 250 различных биомакромолекул [8, 9]. Такая многофункциональность суt c, по-видимому, возможна благодаря конформационной гибкости его окисленного нативного складчатого состояния [10—13], что позволяет структуре белка существовать в различных альтернативных конформациях, зависящих от условий окружающей среды (значения pH, локальных электрических полей и т.д.). Эти ненативные конформации могут различаться в шестой аксильной координации (differ in sixth-axial coordination), по окислительно-восстановительным параметрам, сродству связывания и каталитической активности белка [11, 14, 15].

Возможно одной из наиболее изученных ненативных конформаций суt *с* является так называемое щелочное состояние или состояние IV, которое характеризуется потерей шестого аксиального лиганда Met80 гемового железа

Принятые сокращения: суt *с* – цитохром *с*; GdmCl – гуанидинхлорид; КД – круговой дихроизм; МД – молекулярная динамика.

^{*} Адресат для корреспонденции.

без существенного влияния на третичную и вторичную структуры белка [16-18]. Щелочная трансформация суt с представляет собой конформационное изменение, которое происходит спонтанно в природном cyt c в интервале значений рН 8,5–11 [19, 20]. В митохондриальном суt с исследования рекомбинантной экспрессии [21] при сочетании методов ЯМР [22] и резонансной Рамановской спектроскопии [23] показали, что Lys73 и Lys79, а также, возможно, Lys72 [24] в составе Ω-петли фолдона, состоящей из а.о. 70-85, заменяют нативный лиганд Met80. Эта неоднородность щелочного состояния, представленная несколькими пространственными конфигурациями, вероятно, является причиной трудности получения его кристаллической структуры. Однако структуры двойных и тройных мутантов суt с дрожжей с Lys73 в шестом аксиальном положении гемового железа были определены методами ЯМР и рентгеновской кристаллографии и представляют собой хорошие структурные модели состояния IV [6, 25].

Результаты, полученные в экспериментах с использование кинетических методов остановленной струи и в экспериментах по обмену водорода с использование ЯМР [10, 14, 23, 27–30] позволяют предположить, что механизм щелочного перехода включает как минимум два этапа:

> Cyt³⁺-H (состояние III) \leftrightarrow \leftrightarrow Cyt³⁺- (состояние III) + H \leftrightarrow \leftrightarrow Cyt³⁺ (состояние IV).

Результатом первого шага является одноводородное депротонирование триггерной группы, приводящее к нативному депротонированному состоянию III суt с с экспериментально определенной константой равновесия К_н для диссоциации протонов (рK_H ~ 11) [27]. Эта стадия депротонирования связана со вторым этапом, ограничивающим скорость конформационным изменением cyt c (с константой равновесия $K_{\rm C}$ для структурных изменений, р $K_{\rm C} \sim -2$), что приводит к лигандному обмену Met80 на другой сильный лиганд [30]. Депротонирование триггерной группы в суt *c* дикого типа с р $K_{\rm H} \sim 11$ говорит в пользу остатков 72, 73 и/или 79 [23, 31], но точная идентичность триггерной группы все еще находится в стадии обсуждения [15, 28, 32–34]. Следует отметить, что более поздние исследования указывают на то, что щелочной переход является более сложным процессом, состоящим из нескольких последующих и/или параллельных переходов [31, 35].

Несмотря на интенсивные исследования, функциональная роль щелочных состояний суt c до сих пор неизвестна. Эти не природные конфигурации суt с, по-видимому, похожи на более поздний промежуточный продукт, расположенный вдоль складок [30, 36–38], но были также указания на то, что снижение окислительно-восстановительного потенциала цитохрома с является следствием более открытой структуры гемовой щели, что важно для работы суt c как в цепи переноса электронов [23, 25, 39], так и в апоптозе в связи с усилением активности пероксидазы [11, 40-43]. Дискуссия о функциональной роли щелочно-подобных состояний была подогрета недавними открытиями некоторых посттранскрипционных модификаций суt с млекопитающих и некоторыми естественными точечными мутациями, которые запускают конформацию белка, аналогичную состоянию IV, даже при физиологическом значении pH. Мутант cyt *c* Gly41Ser [44, 45], а также Tyr48His [46] в гене cyt с человека индуцируют ранние щелочные переходы при нейтральном рН, которые способствуют увеличению динамики Ω-петли (40-57 a.o.), диссоциации Met80 и повышению пероксидазной активности суt c [43, 45]. Эти мутанты проявляли повышенную апоптотическую активность, вероятно, за счет усиления связывания и активации Apaf-1 или способствуя реокислению суt c, сборке апоптосом и их активации [44]. Посттрансляционная модификация суt c, например нитрованием (остаток Tyr в положении 74) и фосфорилированием (например, Туr48), которая возникает при окислительном стрессе, приводит к ослаблению аксиальной связи Fe-Met80. Таким образом, эта модификация позволяет осуществлять щелочной переход при физиологическом рН, что, вероятно, связано с повышением пероксидазной активности [15, 41, 47]. Несмотря на возникновение повышенной активности пероксидазы, эти модификации оказывали антиапоптотическое воздействие за счет снижения способности активировать каспазу-9 [41, 47]. Эти данные подтверждают гипотезу о важной функции щелочной конформации суt *c in vivo* [17, 41, 43, 47-49].

С этой позиции возникает вопрос, связанный с пероксидазной активностью щелочной конформации суt c. Diederich et al. [50, 51] для суt c сердца лошади и McClelland et al. [52] для tmK72 суt c и суt c-550 из Saccharomyces cerevisiae показали, что пероксидазная активность белка снижается с увеличением pH из-за замены Met80 аксиальным лигандом с сильным полем, который ингибирует его пероксидазную активность. С другой стороны, было сообщено, что суt c с Lys в качестве шестого аксиального

лиганда обладает повышенной пероксидазной активностью [17, 48, 53, 54], что согласуется с активностью суt c при определенных естественных мутациях и посттрансляционных модификациях [15, 41, 43, 45, 47].

Общепризнано, что каталитическая пероксидазная активность суt с коррелирует с наличием популяции пятикоординатных высокоспиновых видов [17, 48, 55], которые являются следствием присущей этой популяции динамики в области гема [11, 56, 57]. Мы и другие исследователи ранее показали, что динамика структуры белка может быть модулирована изменением физико-химических свойств растворителя солями, за счет эффекта, известного как эффект Хофмейстера, или специфический солевой эффект [58-61]. Модуляция динамики структуры белка может оказывать влияние на глобальную и локальную стабильность, конформационные переходы и активность ферментов [57, 58, 62-64].

В настоящей работе мы проанализировали структуру и термическую стабильность, а также пероксидазную активность, щелочного суt с в присутствии анионов Хофмейстера. Показано, что щелочное состояние суt c имеет (i) компактную структуру с несколько меньшей изотермической стабильностью по сравнению с его нативным состоянием, и (іі) практически отсутствует пероксидазная активность независимо от типа аниона Хофмейстера, присутствующего в растворителе. Наши эксперименты предполагают сильное сродство не природного лиганда к гемовому железу даже в присутствии высокой концентрации денатуранта. Моделирование молекулярной динамики (МД) в сочетании с экспериментальными результатами свидетельствует о чрезвычайно высоком сродстве лизина к гемовому железу.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Цитохром *с* из сердца лошади («Sigma», США) использовали без дополнительной очистки. Перед измерениями белок полностью окисляли добавлением 1 мкл 10 мМ K₃[Fe(CN)₆] к 2,5 мл образца. Концентрацию окисленного суt *с* определяли спектрофотометрически по поглощению при 410 нм ($\varepsilon \approx 106\ 100\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$) при рН 7,0 в 10 мМ натрий-фосфатном буфере. Концентрацию 35%-ного водного раствора перекиси водорода без добавок («Centrachem», Словакия) определяли спектрофотометрически по поглощению при 240 нм ($\varepsilon \approx 40\ M^{-1}\cdot cm^{-1}$) в дистиллированной воде. Концентрацию гваякола (>99%) («Sigma», США) в исходном растворе определяли спектрофотометрически по погло-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

щению при 274 нм ($\varepsilon \approx 2550 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$) [65]. Все остальные химикаты были закуплены у компаний «Fluka», Германия и «Sigma», США. Исходные растворы солей перед использованием фильтровали.

Флуоресцентно-эмиссионная спектроскопия. Измерения флуоресценции проводили с помощью 10 мм кюветы на спектрофлуориметре Varian Cary Eclipse («Varian», США), снабжённом Пельтье-элементом. Щелочное титрование проводили путем добавления очень небольших количеств концентрированного NaOH в раствор, содержащий либо 5 мМ какодилатный буфер, либо буфер с 8 М мочевиной и 0,5 М солью. Температура в кюветах поддерживалась постоянной на уровне $20,0 \pm 0,5$ °C с помощью элемента Пельтье. При титровании регистрировались спектры эмиссионной флуоресценции cyt c в диапазоне 310-400 нм при длине волны возбуждения 290 нм. Концентрация суt c в кювете составляла 9 мкМ. В качестве эталона был взят спектр при рН 6,0.

Кривые щелочной изомеризации строили в виде зависимости значений флуоресценции при 350 нм от рН. Значения р K_a кривых щелочной изомеризации определяли по следующему уравнению:

$$f = \frac{A_N + A_D 10^{n(pK_a - pH)}}{1 + 10^{n(pK_a - pH)}},$$
 (1)

где f — фракция суt c в щелочном состоянии, A_N и A_D — интенсивность флуоресценции в точке 350 нм нативной и денатурированной форм, а n — число протонов, участвующих в переходе. Значения pH измеряли непосредственно в кюветах с помощью стеклянного микроэлектрода Sensorex (до и после регистрации спектров).

Измерения термической стабильности. Термическую денатурацию суt c регистрировали при длине волны возбуждения 290 нм и излучения — 350 нм, при постоянной скорости сканирования 1 °С/мин и в присутствии 0,5 М солей в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, рН 7,0, и 0,5 М солей в 50 мМ глицин-NaOH буфере, рН 10,0. Конечная концентрация белка составляла 9 мкМ. Кривые термической денатурации суt c были проанализированы с использованием следующего уравнения, описывающего двух-фазный переход:

$$I_{obs} = \frac{I_N + m_N T + (I_U + m_U T) \exp\left[\frac{\Delta H_{trs}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{trs}}\right)\right]}{1 + \exp\left[\frac{\Delta H_{trs}}{R} \left(\frac{1}{T} - \frac{1}{T_{trs}}\right)\right]},$$
(2)

где I_{obs} — наблюдаемая интенсивность флуоресценции при температуре Т, I_N и I_U , а также m_N и m_U представляют собой пересечения и наклоны (intercepts and slopes) нативных (преденатурированных) и развившихся (постденатурированных) исходных линий соответственно, а ΔH_{trs} — энтальпия при температуре перехода T_{trs} .

Измерения методом кругового дихроизма (КД). После изотермической денатурации суt *c* гуанидинхлоридом (GdmCl) проводили измерение КД в дальней УФ области при 220 нм в 1 мм кювете с помощью спектрополяриметра JASCO J-810 («Jasco», Япония). Измерения КД проводили в растворе, содержавшем 25 мкМ суt *c* в 5 мМ буфере натрий-какодилат рН 6 и в 10 мМ буфере натрий-фосфатном/NaOH рН 11. Измерения проводили при 20 °C.

Свободная энергия разворачивания Гиббса (ΔG), которая выражает стабильность белка, и величина *m*, которая зависит от площади поверхности белка, подвергнутого воздействию растворителя при разворачивании [66], были оценены с применением нелинейного анализа наименьших квадратов, используемого в рассматриваемой модели [67].

$$\theta = \frac{\Delta \theta_N + m_N[D] + (\Delta \theta_U + m_U[D]) \exp(\Delta G / RT + m[D] / RT)}{1 + \exp(\Delta G / RT + m[D] / RT)}.$$
(3)

В этой модели отражена наблюдаемая эллиптичность (θ) и концентрация денатуранта [D], с входящими в неё параметрами $\Delta \theta_{\rm N}, \Delta \theta_{\rm U},$ $m_{\rm N}$, $m_{\rm U}$, *m* и ΔG , соответствующими модели. Здесь $\Delta \theta_{\rm N}$ и $\Delta \theta_{\rm U}$ представляют собой пересечения базовых кривых преденатурации и постденатурации соответственно, а m_N и m_U представляют собой наклоны исходных линий преденатурации и постденатурации соответственно. Значения ΔG и *m* представляют собой пересечение и наклон линейной экстраполяции происходящих изменений свободной энергии в зависимости от концентрации денатуранта. Это уравнение учитывает линейную зависимость преденатурационной и постденатурационной областей развернувшейся кривой [67].

Измерения методом абсорбционной спектроскопии. Спектры поглощения измеряли в 10 мм кювете на спектрофотометре Varian Cary Bio 100 («Varian», США), оснащенном элементом Пельтье. Спектры поглощения измеряли в диапазоне 600–800 нм в присутствии и в отсутствие 8 М мочевины и 0,5 М солей (Na₂HPO₄, NaCl и NaSCN) в 10 мМ натрий-фосфатном буфере при pH 7, 10 и 12. Концентрация суt *c* составляла 100 мкм.

Кинетические исследования пероксидазной активности цитохрома с. Анализ активности про-

водили в 10 мм кварцевой кювете. Использовали свежеприготовленный исходный раствор H₂O₂, и его концентрацию проверяли спектрофотометрически ($\epsilon_{240} = 40 \text{ M}^{-1} \cdot \text{см}^{-1}$). Реакцию образования тетрагуаякола контролировали при 470 нм с помощью спектрофотометра Specord S300 UV-VIS diode-array («Analytik Jena AG», Германия), оснащенного элементом Пельтье. Реакции измеряли при 20 °С в присутствии и в отсутствие 0,5 М солей в 10 мМ натрий-фосфатном буфере при рН 7,0-7,5; 10 мМ Tris-HCl при pH 8,0-8,5 и 10 мМ глицин-NaOH буфере при pH 9,0-10,0. Реакционные смеси содержали 1,8 мкМ суt c, 1 мМ гваякола и соответствующую концентрацию (5-20 мМ) перекиси водорода. Реакцию запускали добавлением H_2O_2 , как сообщалось ранее [57].

Моделирование методом молекулярной динамики (МД). Конформации суt *с* с шестым лигандом Lys72, Lys73 и Lys79 были построены вручную с помощью визуализатора BIOVIA Discovery Studio 2020 г. выпуска [68]. Нативная структура cyt c, основанная на экспериментальной геометрии суt c с разрешением 1,9 Å (PDB ID: 1HRC) [69], была использована для построения вышеупомянутых конформационных форм. Комбинация программ Maestro/Desmond выпуска 2020 г. [70] была использована для моделирования различных конформационных состояний суt *c*, которые были сольватированы в каждом сайте связывания, используя программу Maestro. На этом этапе была использована SPC water Model [71] с молекулами воды в 1 нм буфере вокруг конформеров суt с. Полученные структуры были минимизированы и уравновешены при первом 5 нс запуске NPT (давление 1,01325 бар) моделирования при 10 К. Для проведения исследований моделирования использовалось силовое поле OPLS-2005 (современная версия семейства силовых полей OPLS [72, 73]). Окончательные структуры были подвергнуты в течение 10 нс NPT моделированию (давление 1,01325 бар) с помощью программы Desmond при 300 К. Кроме того, веб-сервис ChExVis [74] был использован для прогнозирования внутримолекулярных каналов всех четырех конформационных форм суt *c*.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Специфическое влияние анионов на щелочную изомеризацию и термостабильность суt *c*. Тот факт, что соли влияют на щелочной переход суt *c*, был недавно продемонстрирован на ряде солей Хофмейстера [62]. В данной работе, по сравнению с предыдущей, мы еще больше



Рис. 1. Температурная денатурация суt *с* в отсутствие соли (белые кружки) и в присутствии 0,5 М солей: Na₂HPO₄ (голубые кружки), Na₂SO₄ (синие перевернутые треугольники), CH₃COONa (зеленые треугольники), NaCl (черные кружки), NaBr (красные ромбы), NaClO₄ (серые квадраты) и NaSCN (пурпурные перевернутые треугольники) в 50 мМ натрий-фосфатном буфере, pH 7 (*a*) и в 50 мМ глицин-NaOH буфере, pH 10 (*b*). Интенсивность флуоресценции контролировалась при длине волны излучения 350 нм после возбуждения при длине волны 290 нм. *с* – Корреляция между значениями pK_a и T_m, полученными в присутствии исследуемых солей (коэффициент корреляции линейной зависимости равен 0,8895). (С цветными вариантами рис. 1–6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

расширили количество изученных солей. Полученные значения pK_a щелочной изомеризации суt c (табл. S1 в Приложении) наглядно демонстрируют специфическое действие анионов в зависимости от их положения в ряду Хофмейстера. Фактически, щелочное состояние, состояние IV, стабилизируется хаотропными анионами по мере уменьшения значений pK_a в процессе перехода, т.е. состояние III суt c дестабилизируется в направлении от космотропных к хаотропным анионам.

Специфическое влияние анионов на термостабильность суt *с* в состояниях III и IV изучали путем мониторинга интенсивности флуорес-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

ценции при pH 7 и 10 (рис. 1, *а* и *b*), и полученные значения T_m приведены в табл. S2 Приложения. Тепловые переходы цитохрома *с* при всех исследованных условиях делают очевидным двойной характер его состояний. Температуры перехода определяли путем внесения экспериментальных данных в уравнение 2. При низкой ионной силе температура перехода суt *с* при pH 10 (79,5 °C) была примерно на 6 °C ниже по сравнению с температурой при pH 7 (85,6 °C). Такая же тенденция наблюдалась и в присутствии 0,5 М анионов. Значения температур перехода суt *с* при pH 10 были во всех солях, кроме того, в присутствии хаотропного перхлората и



Рис. 2. Изотермическая денатурация суt *с* в присутствии GdmCl в 5 мМ натрий-какодилате, pH 6 (чёрный) и в 10 мМ натрий-фосфат/NaOH, pH 11 (синий), сопровождающаяся эллиптичностью при 222 нм

тиоцианата они были ниже по сравнению со значениями при pH 7 (табл. S2 в Приложении). При обоих pH термостабильность суt *с* плавно снижается от космотропных к хаотропным анионам (рис. 1, *а* и *b*; табл. S2 в Приложении) в соответствии с известным эффектом Хофмейстера на стабильность белка [75].

Отметим, что интенсивность флуоресценции при термической денатурации при pH 10 была примерно в два раза ниже, чем при pH 7, что свидетельствует о более компактном состоянии термически денатурированного цитохрома *c* при щелочном pH, чем при нейтральном pH (рис. 1, *a* и *b*). График зависимости величины p K_a от температуры перехода цитохрома *c* в присутствии исследуемых солей демонстрирует корреляцию, указывающую на взаимосвязь между этими параметрами (рис. 1, *c*).

Изотермическая денатурация цитохрома с в нативном и щелочном состояниях. Для сравнения стабильности нативного и щелочного состояний суt с мы также провели эксперименты по изотермической денатурации, контролируя значения эллиптичности при 220 нм в присутствии гуанидинхлорида (рис. 2). GdmCl-индуцированное разворачивание нативного и щелочного состояний суt *с* было обратимым, что позволило применить равновесный термодинамический анализ. Значения эллиптичности, измеренные при 220 нм, были нормированы по минимальным и максимальным значениям эллиптичности в исследуемом диапазоне концентраций денатуранта. Экспериментальные данные эллиптичности, в зависимости от концентрации GdmCl, были получены в соответствии с уравнением 3. В результате был получен набор термодинамических параметров для нативного цитохрома *с* при pH 6 (*m* = 12,7 ± 0,7 кДж/моль/м и $\Delta G = 34.9 \pm 2.1$ кДж/моль) и щелочного цитохрома *с* при pH 11 ($m = 10.9 \pm 0.6$ кДж/моль/м и $\Delta G = 29.9 \pm 1.6$ кДж/моль). Эти результаты свидетельствуют о том, что в нативном состоянии cvt с имеет более высокую стабильность ~5 кДж/моль, чем в щелочном состоянии, что согласуется с результатами термической денатурации. Полученные значения *m*, пропорциональные площади поверхности белка, обращённой в растворитель [66], позволяют предположить, что развернутая конформация обоих состояний III и IV аналогична, а структура щелочного состояния несколько более открыта по сравнению с нативным состоянием cvt *c*.

Пероксидазная активность щелочного цитохрома с в присутствии анионов. Пероксидазную активность суt c в диапазоне pH 7–10 определяли при окислении гваякола, как было описано ранее [57]. При pH 7 у суt c равномерно увеличивалась пероксидазная активность, начиная от присутствия космотропных и до хаотропных анионов. Действительно, константа скорости второго порядка пероксидазной активности суt с увеличивалась в 2,5 раза в присутствии хаотропных анионов по сравнению с таковой в присутствии космотропных анионов или в отсутствие солей (рис. 3, табл. S3 в Приложении). Однако при постепенном увеличении рН константа скорости второго порядка пероксидазной активности суt с снижалась независимо от типа аниона, и при рН 10 пероксидазная активность суt с не обнаруживалась. Отметим, что в присутствии 0,5 М перхлората пероксидазная активность суt c наиболее высока при pH 6, но эта активность исчезает уже при рН 8. Это наблюдение ясно показывает, что пероксидазная активность суt с исчезает при переходе его в состояние IV (р K_a щелочной изомеризации суt *c* в присутствии 0,5 M NaClO₄ составляет ~7,5), что согласуется с ингибированной пероксидазной активностью суt с в присутствии всех исследуемых солей при рН 10.

Влияние анионов на щелочную изомеризацию денатурированного суt c. Анализ щелочной изомеризации суt c в присутствии 8 М мочевины позволил проверить гипотезу о том, что сродство Lys к гемовому железу при щелочном значении pH сохраняется даже в таких суровых условиях. При инкубации суt c в 8 М мочевине нативный лиганд гемового железа в суt c, Met80, заменяется другим сильным лигандом, His33, при этом небольшая часть суt c находится в неупорядоченном состоянии, похожем на пентакоординированное [76]. Фактически, именно на это указывает спектр поглощения суt c в 8 М мо-



Рис. 3. Зависимость нормированного коэффициента константы скорости второго порядка пероксидазной активности суt c, измеренного при окислении гваякола, от рН в присутствии и в отсутствие разного рода солей: без соли (белый), Na₂HPO₄ (голубой), Na₂SO₄ (синий), CH₃COONa (зеленый), раствор NaCl (черный), NaBr (красный), NaNO₃ (оранжевый) и NaClO₄ (серый)

чевине в области 600-700 нм (рис. 4, *a*): (i) полоса 695 нм отсутствует и (ii) присутствует слабая полоса 620 нм (показатель высокоспинового состояния гемового железа), соответствующая ~5% от высокоспинового состояния суt c, наблюдаемого при низкой ионной силе при pH 2. Щелочную изомеризацию в 8 М мочевине можно проследить с помощью другой характеристики суt с – собственной флуоресценции триптофана. Суt с содержит только один остаток триптофана (Trp59), который погружён в гемовую щель вблизи гема и отражает малейшие изменения своего (Тгр59) расстояния от гема [77]. В нативной конформации cyt *с* флуоресцентное излучение триптофана гасится за счет переноса гемом энергии Фестера [55], но при рН 7 в 8 М мочевине интенсивность флуоресценции сут с достигает ~60-65% от флуоресценции NATA (N-ацетил-L-триптофанамида) –



Рис. 4. Спектры поглощения суt *c* в области 600–800 нм, измеренные при pH 7 (*a*), pH 10 (*b*) и PH 12 (*c*) в буфере (пунктирная линия) и в присутствии 8 М мочевины при pH 7, 10 и 12 в отсутствие солей (серая линия) и в присутствии 0,5 М Na₂HPO₄ (голубая линия), 0,5 М NaCl (черная линия) и 0,5 М NaSCN (пурпурная линия). d – Зависимости интенсивности флуоресценции суt *c* при 350 нм в 8 М мочевине в отсутствие соли в 5 мМ какодилатном буфере (белые кружки) и в присутствии 0,5 М натриевых солей: Na₂HPO₄ (голубые кружки), Na₂SO₄ (синие перевернутые треугольники), CH₃COONa (зеленые треугольники), NaCl (черные кружки), NaBr (красные ромбы), NaClO₄ (серые квадраты) и NaSCN (пурпурные перевернутые треугольники)

аналога остатка триптофана (данные не приведены).

Щелочная изомеризация суt с в 8 М мочевине в интервале pH 6-12 явно указывает на три переходные состояния (рис. 4): (i) первый переход состоит в неожиданном снижении флуоресценции почти во всех условиях (кроме присутствия тиоцианата) со значением р K_a 7,7–9,1 (табл. S4 в Приложении), а значение $n \sim 1$ говорит о том, что депротонированию подверглась одна группа. Эти переходы отражают изменение конформации молекул, находящихся в состоянии низкоспинового гемового железа (рис. 4, a), и небольшой популяции молекул с высокоспиновым гемом железа (в случае хаотропов) в другое низкоспиновое состояние гемового железа (рис. 4, b); (ii) второй переход заключается в увеличении флуоресценции триптофана до исходного, т.е. на уровне рН 6, со значениями р K_a 11,0 ± 0,4 и значениями $n \sim (2-3)$, подразумевающими более чем одну группу, подвергающуюся депротонированию (табл. S4 в Приложении). Окончательная конформация суt с во втором переходе представлена низкоспиновым гемом железа (рис. 4, с). Эти переходы, скорее всего, представляют собой щелочно-подобные переходы к конформации Lys-гемового железа при более низких значениях pH (6–10), т.е. в IVподобное состоянию, и переход в V-подобное состояние в диапазоне рН 10-12.



Рис. 5. Суперпозиция нативной структуры цитохрома *c*, а также различных конформаций, в которых различные лизины образуют координационную связь с гемовым железом. Гибкость петли выделена светло-оранжевым цветом, а стрелки иллюстрируют движение петли, облегчающее взаимодействие К72, К73 или К79 с гемовым железом. (Обозначения: К – остаток Lys, М – Met, W – Trp)

Анионы Хофмейстера существенно влияют на pH-переходы суt c в 8 М мочевине. В присутствии космотропных анионов (фосфатов и сульфатов) снижение флуоресценции наиболее выражено, в то время как в присутствии хаотропов (тиоцианата и перхлората) изменения флуоресценции триптофана довольно незначительны (рис. 4, d).

Основываясь на анионзависимом снижении флуоресценции триптофана, мы предполагаем, что анионы в щелочном состоянии не стабилизируют одинаково все возможные состояния лигирования. Для решения этой гипотезы мы исследовали молекулярную динамику суt *c* в различных лигированных состояниях: Met80, Lys79, Lys73 и Lys72.

Моделирование МД различных лигированных состояний суt c. Моделирование МД различных связанных состояний суt с предсказывает различную ориентацию (рис. 5) и различную гибкость конформации петель (рис. 6). На рис. 5 показана исходная геометрия для моделирования. Желтым цветом выделены конформации петель (71-87 a.o.), содержащих Met80, Lys72, Lys73 и Lys79. В то время как небольшие конформационные изменения необходимы для координационного обмена Met80 на Lys79, больший конформационный сдвиг необходим для того, чтобы Lys72 или Lys73 взаимодействовали с гемовым железом. Этот конформационный сдвиг связан с большей гибкостью этой петли по сравнению с нативной формой суt c. Более значительная гибкость петли (71-87 а.о.), когда Lys72, Lys73 или Lys79 координационно связываются с гемовым железом, проиллюстрирована на рис. 6, b-d на схемах петель различной окраски. Эти результаты хорошо согласуются с данными Oviedo-Rouco et al. [78], которые предсказали, что сегменты петли (71-87 а.о.) и петли (41-57 а.о.) будут более гибкие для конформеров, содержащих Lys в положении шестого лиганда. Сравнение гибкости петель показано на рис. 6, где суt *с* представлен в виде ленты с отмеченными аминокислотами, координационно связывающимися с атомом гемового железа. Визуализируется около 1000 конформаций для всех форм суt c, которые были сохранены при 10 нс МД-моделировании в водной среде (рис. S1 и S2 в Приложении).

Координационная связь Fe-S, возникающая в случае Met80 и нативного суt c (рис. 6, a), вероятно, приводит к более высокой стабилизации геометрии петли, чем координационная связь Fe-N, которая имеется в случае Lys72, Lys73 и Lys79. Как следствие, в случае конформеров Lys гибкость петли, по-видимому, выше (рис. 6, b-d). Интересно, что аминокислоты сегмента пет-



Рис. 6. Конформационные ансамбли различных форм суt *c* по отношению к координации гема железо—сера (для случая Met80) и координации азот—железо (в случае Lys72, Lys73 и Lys79). Различными цветами обозначены петли (41–57 а.о.) и (71–87 а.о.). При координационном связывании Lys с гемовым железом была обнаружена бо́льшая гибкость петель, чем при координационной связи с серой нативного суt *c*. (Обозначения: К — остаток Lys, M — Met)

ли (41–57 а.о.), которые не находятся в прямом взаимодействии с гемовым железом, также обладают более высокой гибкостью в случае Lys-конформеров по сравнению с нативным состоянием суt *c*.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Щелочное состояние суt c, включающее в себя смесь по меньшей мере двух конформаций с ненативными лигандами гемового железа, является единственным из пяти различных состояний, кроме нативного, в диапазоне pH 0–14, с низкоспиновым состоянием гемового железа [79]. Цитохром c в состояниях III и IV имеет в целом сходные свойства, которые суммированы в таблице. Однако пониженный восстановительный потенциал в состоянии IV, по сравнению с состоянием III, привлёк большое внимание. Действительно, более низкий (на 0,3–0,5 В) восстановительный потенциал суt c в состоянии IV [53, 80] превращал суt c из обратимого переносчика электрона между комплексами III

и IV в однонаправленного транспортёра электрона (к комплексу IV) с возможной регуляторной ролью in vivo [19, 81]. Однако только недавно было обнаружено, что некоторые естественные мутации [43, 45, 82, 83] и посттрансляционные модификации [15, 41, 47, 84] смещают щелочную изомеризацию в нейтральную, близкую к физиологической, область значений рН. Предполагается, что щелочное состояние играет определенную роль в проапоптотических событиях, во время которых суt с повышает свою способность катализировать пероксидазную реакцию [17, 26, 41, 49, 52]. Систематически сообщалось, что в условиях, благоприятствующих состоянию IV, как образца аксиального взаимодействия, суt с обладает повышенной пероксидазной активностью по сравнению с состоянием III [48, 53, 54]. Интересно, что в суt с как в состоянии III, так и в состоянии IV, присутствуют низкоспиновые формы гемового железа, что означает наличие сильного шестого аксиального лиганда и, следовательно, отсутствие пероксидазной активности. Гемовый белок, способный катализировать пероксидазные реакции, должен находиться в пента-координированном состоянии с вакантным шестым сайтом, что является неизбежным условием доступности активного участка для субстрата. Действительно, было показано, что пероксидазная активность суt с является результатом временно формирующегося пента-координированного состояния гема. Это считается следствием присущей данной области гема динамики - обратимого разворачивания наименее стабильных фолдонов суt c [57], т.е. так называемых инфракрасных и красных фолдонов, состоящих из а.о. 41-57 и 71-87 соответственно [85]. Это предположение основано на экспериментальных наблюдениях связывания малых лигандов, таких как цианид [60, 86, 87] или имидазол [88], с гемовым железом. Основываясь на наших выводах о том, что анионы Хофмейстера влияют на динамику в области гема, как показано на анионной зависимости константы скорости связывания цианида с гемовым железом [60], мы предположили, что эффект Хофмейстера должен влиять также на пероксидазную активность суt c в состоянии III. Фактически, полученные результаты пероксидазной активности суt c, контролируемой окислением гваякола (рис. 3), подтверждают эту гипотезу. Показано, что пероксидазная активность суt с в присутствии солей возрастает в направлении от космотропных к хаотропным анионам в соответствии с повышенной динамикой в области гема. Это согласуется с нашей предыдущей работой, в которой мы наблюдали повышенную окислительную модификацию сут с перекисью водорода в присутствии хаотропных, по сравнению с космотропными, анионов [89]. Однако в то время, при измерении методом FOX2, мы не наблюдали разницы в пероксидазной активности cvt c, что свидетельствует о его меньшей чувствительности по сравнению с методом, основанном на окислении гваякола.

В наших исследованиях, посвященных эффекту Хофмейстера, мы отмечали, что анионы влияют не только на динамику cyt c в области гема, но и на значения pK_a в его щелочном состоянии [62]. Этот вывод согласуется с наблюдениями локальной дестабилизации Ω-петли (70-85 а.о.) в результате мутаций [90-93], посттрансляционной модификации [41, 43, 47, 49, 55], физико-химических факторов, таких как повышенная концентрация денатурантов [76] или температура [94-96], что снижает значения р K_a щелочной изомеризации суt c. Наши результаты подтверждают этот вывод, как видно из корреляции между стабильностью в целом, представленной значениями T_m, и значениями рКа, наблюдаемыми в присутствии солей (рис. 1, *с*).

Из-за сопоставимости стабильности состояний III и IV (рис. 2) мы предположили аналогичное влияние анионов Хофмейстера на пероксидазную активность состояния IV, как это наблюдалось для состояния III. Однако во всех изученных условиях, с солями или без них, суt с в состоянии IV обладает незначительной пероксидазной активностью. Наше объяснение этого наблюдения состоит в том, что Met80, шестой лиганд состояния III, находится в относительно лабильном положении, конкурируя с другими аминокислотными остатками (Lys) за связь с гемовым железом, как это следует из детального анализа спектральных свойств суt c, выполненного группой Schweitzer-Stenner [97, 98]. Повидимому, следствием этой конкуренции за гемовое железо является существование популяции в пента-координированном состоянии, способной катализировать пероксидазные реакции. С другой стороны, несмотря на аналогичную гетерогенность щелочного состояния суt c, представленную наличием двух гем-железных лигандов, Lys73 и Lys79 [31], пероксидазная активность этого состояния ингибируется. По-видимому, координационная связь Lys73 и Lys79 с гемовым железом при щелочном значении рН прочна и ограничена в диссоциации, препятствуя таким образом образованию пента-координированного состояния. Мы проверили прочность этой координационной связи(ей) титрованием суt c до щелочного значения рН в присутствии 8 М мочевины с солями Хофмейстера и без них (рис. 4). Russell и Bren [76] показали, что суt *с* в присутствии 8 М мочевины существует в трёх (по крайней мере) популяциях, где шестой лиганд свободен либо занят Lys79 или His 33. При титровании до щелочного значения рН равновесие этих популяций, вероятно, смещается в сторону лиганда(ов) Lys. Действительно, мы наблюдали снижение флуоресценции Trp59 при pH 10 в отсутствие солей, что свидетельствует о более компактном состоянии со значением pK_a , сопоставимым со значениями щелочной изомеризации суt с в присутствии хаотропных солей в отсутствии мочевины.

Компактность такого щелочно-подобного состояния (в 8 М мочевине) суt c, по-видимому, может модулироваться солями Хофмейстера. В присутствии космотропных сульфатных и фосфатных солей снижение наиболее выражено, в то время как в присутствии хаотропных солей, таких как тиоцианат натрия, щелочной переход не наблюдается (рис. 4, d). Это говорит о том, что соли хаотропа дестабилизируют координационную связь в щелочно-подобном состоянии суt c в присутствии 8 М мочевины, в отличие от

Феррицитохром с		Нативное состояние III	Щелочное состояние IV
Структура	третичный	глобулярная упаковка [69, 102, 103]	глобулярная упаковка [25, 26]
	вторичный	пять α-спиралей и два коротких β- слоя, взаимосвязанных Ω-петлями [69, 102, 104–106]	то же, что и нативное состояние III (не повлияло) [16, 18]
	щель гема	 закрытая форма [107] широкая сеть водородных связей [69, 108, 109] 	 закрытая форма [104], более 20% выявленного гема, чем в нативном состоянии [25] искажение в сети Н-связей между складками Ω-петли (70–85 и 40–57) [15, 83, 110]
Шестой аксиальный лиганд		Met80 [69, 102, 111]	Lys73/79/72 [21–23, 27, 90, 112–115]
Спиновое состояние гемового железа		низкое [69, 116, 117]	низкое [20, 118]
Восстановительный потенциал		+255 мВ при рН 7 [115, 119–122]	 +120 мВ при рН 10 [27, 123] на 0,3-0,5 В ниже, чем состояние III [53, 80]
Стабильность		 изотермальная денатурация: ~ 34–35 кДж/моль [124, данная работа] температурная денатурация: 85,6 ± 0,1 °С (данная работа) основанное на редокс потенциале состояние III на ~42 кДж/моль более стабильно, чем состояние IV [80] 	 изотермальная денатурация: ~ 30 кДж/моль [данная работа] температурная денатурация: 79,5 ± 0,3 °С [данная работа]
Пероксидазная активность		низкая пероксидазная активность [7]	 повышенная пероксидазная активность [48, 53, 54] нет пероксидазной активности [50–52, данная работа]

Сравнение структурных свойств, аксиального лигирования, спинового состояния, физического и термодинамического, а также активности в нативном (состояние III) и щелочном (состояние IV) состояниях суt *c*

космотропных солей, которые оказывают сильное стабилизирующее действие на эту связь. Предполагая, что разные лиганды в щелочноподобном состоянии обладают разной стабильностью по аналогии с ситуацией при нейтральном значении рН [99], мы попытались определить наиболее стабильный конформер щелочного состояния на основе расстояния между Тгр59 и гемовым железом. МД-моделирование показало, что самое короткое расстояние между Trp59 и гемовым железом, соответствующее наиболее компактному состоянию, было получено для Lys79-конформера (~8,9 Å) (рис. 6). Расстояние для нативного состояния с лигандом Met80 составляет ~9,2 Å, а для конформеров Lys72 и Lys73 – это ~9,3 Å. Хотя эти задачи не обязательно должны соответствовать ситуации в случае щелочного состояния, идентификация Lys79, как наиболее стабильного конформера щелочного состояния, согласуется с работой Maity et al. [14]. Работа Nelson и Bowler [29] с изоформой-1 суt с также свидетельствует в пользу роли Lys79 как наиболее стабильной шелочной формы cvt c. Они показали, что из-за структурной близости Lys73 и Lys79 от-

шее структурное нарушение происходит для гемового лиганда в положении 73, чем для лиганда в положении 79, когда он замещает Меt80. Наше МД-моделирование показало, что структурные возмущения во время щелочной изомеризации были связаны с одним специфическим фолдоном Ω -петли (70–85 а.о., красный фолдон) в сочетании с фолдоном Ω -петли (40–57 а.о., черный, называемый также инфракрасным, фолдон), что согласуется с теорией фолдона Englander [100, 101] и работами Oviedo-Rouco et al. [15, 78].

носительно связи железо-Met80 гораздо боль-

В заключение мы показываем, что образование щелочного состояния цитохрома *с* коррелирует со стабильностью белка и может модулироваться солями Хофмейстера посредством специфического анионного эффекта. Мы пришли к выводу, что конформационная стабильность состояний III и IV сравнима, но, в отличие от состояния III, щелочное состояние не обладает пероксидазной активности, что указывает на присутствие сильного лиганда, скорее всего, Lys79.

Финансирование. Эта работа была поддержана исследовательским грантом, предоставленным Словацким агентством исследований и разработок (грант № APVV-15-0069) и грантовым агентством Министерства образования, науки, исследований и спорта Словацкой Республики (грант № VEGA 2/0009/17). Данная публикация является результатом реализации проекта: Открытое научное сообщество для современных междисциплинарных исследований в медицине (Акроним: OPENMED), ITMS2014 +: 313011V455 при поддержке Интегрированной инфраструктуры операционной программы, финансируемой ЕФРР.

1. Radi, R., Turrens, J. F., and Freeman, B. A. (1991) Cytochrome *c*-catalyzed membrane lipid peroxidation by hydrogen peroxide, *Arch. Biochem. Biophys.*, **288**, 118-125, doi: 10.1016/0003-9861(91)90172-f.

- Atlante, A., Calissano, P., Bobba, A., Azzariti, A., Marra, E., and Passarella, S. (2000) Cytochrome *c* is released from mitochondria in a reactive oxygen species (ROS)-dependent fashion and can operate as a ROS scavenger and as a respiratory substrate in cerebellar neurons undergoing excitotoxic death, J. Biol. Chem., 275, 37159-37166, doi: 10.1074/jbc.M002361200.
- Paradies, G., Petrosilio, G., Pistolese, M., and Ruggiero, F. M. (2000) The effect of reactive oxygen species generated from the mitochondrial electron transfer chain on the cytochrome *c* oxidase activity and on the cardiolipin content in bovine heart submitochondrial particles, *FEBS Lett.*, 466, 323-326, doi: 10.1016/s0014-5793(00)01082-6.
- Pereverzev, M. O., Vygodina, T. V., Konstantinov, A. A., and Skulachev, V. P. (2003) Cytochrome c, an ideal antioxidant, *Biochem. Soc. Trans.*, **31**, 1312-1315. doi: 10.1042/bst0311312.
- Biochem. Soc. Trans., 31, 1312-1315, doi: 10.1042/bst0311312.
 Liu, X., Kim, C. N., Yang, J., Jemmerson, R., and Wang, X. (1996) Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome *c*, *Cell*, 86, 147-157, doi: 10.1016/s0092-8674(00)80085-9.
- Jiang, X., and Wang, X. (2004) Cytochrome *c*-mediated apoptosis, *Annu. Rev. Biochem.*, 73, 87-106, doi: 10.1146/ annurev.biochem.73.011303.073706.
- Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., et al. (2005) Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors, *Nat. Chem. Biol.*, 1, 223-232, doi: 10.1038/nchembio727.
 Chapple, C. E., Robisson, B., Spinelli, L., Guien, C.,
- Chapple, C. E., Robisson, B., Spinelli, L., Guien, C., Becker, E., and Brun, C. (2015) Extreme multifunctional proteins identified from a human protein interaction network, *Nat. Commun.*, 6, 7412, doi: 10.1038/ncomms8412.
- González-Arzola, K., Velázquez-Cruz, A., Guerra-Castellano, A., Casado-Combreras, M. A., Pérez-Mejías, G., et al. (2019) New moonlighting functions of mitochondrial cytochrome *c* in the cytoplasm and nucleus, *FEBS Lett.*, **593**, 3101-3119, doi: 10.1002/1873-3468.13655.
- Cherney, M. M., and Bowler, B. E. (2011) Protein dynamics and function: making new strides with an old warhorse, the alkaline transition of cytochrome *c*, *Coord. Chem. Rev.*, 255, 664-677, doi: 10.1016/j.ccr.2010.09.014.
- Hannibal, L., Tomasina, F., Capdevila, D. A., Demicheli, V., Tortora, V., et al. (2016) Alternative conformations of cytochrome *c*: structure, function, and detection, *Biochemistry*, 55, 407-428, doi: 10.1021/acs.biochem.5b01385.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии прямого или потенциального конфликта интересов, связанного с публикацией этой статьи.

Соблюдение этических норм. Эта статья не содержит описания исследований, выполненных авторами с участием человека или животных в качестве объектов.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (http:// protein.bio.msu.ru/biokhimiya/) и на сайте издательства Springer (https://link.springer.com/ journal/10541), том 86, вып. 1, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schweitzer-Stenner, R. (2018) Relating the multi-functionality of cytochrome *c* to membrane binding and structural conversion, *Biophys. Rev.*, **10**, 1151-1185, doi: 10.1007/s12551-018-0409-4.
- Milorey, B., Schweitzer-Stenner, R., Kurbaj, R., and Malyshka, D. (2019) pH-induced switch between different modes of cytochrome *c* binding to cardiolipin-containing liposomes, *ACS Omega*, 4, 1386-14000, doi: 10.1021/ acsomega.8b02574.
- 14. Maity, H., Rumbley, J. N., and Englander, S. W. (2006) Functional role of a protein foldon – an Ω -loop foldon controls the alkaline transition in ferricytochrome *c*, *Proteins*, **63**, 349-355, doi: 10.1002/prot.20757.
- Oviedo-Rouco, S., Castro, M. A., Alvarez-Paggi, D, Spedalieri, C., Tortora, V., et al. (2019) The alkaline transition of cytochrome *c* revisited: effects of electrostatic interactions and tyrosine nitration on the reaction dynamics, *Arch. Biochem. Biophys.*, 665, 96-106, doi: 10.1016/ j.abb.2019.02.016.
- Oellerich, S., Waxckerbarth, H., and Hildebrandt, P. (2002) Spectroscopic characterization of nonnative conformational states of cytochrome *c*, *J. Phys. Chem. B*, **106**, 6566-6580, doi: 10.1021/jp013841g.
- Alvarez-Paggi, D., Hannibal, L., Castro, M. A., Oviedo-Rouco, S., Demicheli, V., et al. (2017) Multifunctional cytochrome c: learning new tricks from an old dog, *Chem. Rev.*, **117**, 13382-13460, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00257.
- Milazzo, L., Tognaccini, L., Howes, B. D., and Smulevich, G. (2018) Probing the non-native states of cytochrome c with resonance Raman spectroscopy: a tool for investigating the structure-function relationship, *J. Raman. Spectrosc.*, 49, 1041-1055, doi: 10.1002/jrs.5315.
- Osheroff, N., Borden, D., Koppenol, W. H., and Margoliash, E. (1980) Electrostatic interactions in cytochrome c. The role of interactions between residues 13 and 90 and residues 79 and 47 in stabilizing the heme crevice structure, J. Biol. Chem., 255, 1689-1697.
 Moore, G. R., and Pettigrew, G. W. (1990) Cytochromes c:
- Moore, G. R., and Pettigrew, G. W. (1990) Cytochromes c: Evolutionary, Structural and Physicochemical Aspects, Springer-Verlag, New York.
 Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont,
- Pollock, W. B., Rosell, F. I., Twitchett, M. B., Dumont, M. E., and Mauk, A. G. (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome *c*. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome *c* and the alkaline conformational transition, *Biochemistry*, **37**, 6124-6131, doi: 10.1021/bi972188d.
- 22. Rosell, F. I., Ferrer, J. C., and Mauk, A. G. (1998) Protonlinked protein-conformational switching: definition of the alkaline conformational transition of yeast iso-1-ferricy-

tochrome c, J. Am. Chem. Soc., **120**, 11234-11245, doi: 10.1021/ja971756.

- Döpner, S., Hildebrandt, P., Rosell, F. I., and Mauk, A. G. (1998) Alkaline conformational transitions of ferricyt-cohrome *c* studied by Resonance Raman spectroscopy, *J. Am. Chem. Soc.*, **120**, 11246-11255, doi: 10.1021/ja9717572.
- Krishna, M. M. G., Maity, H., Rumbley, J. N., Lin, Y., and Englander, S. W. (2006) Order of steps in the cytochrome *c* folding pathway: evidence for a sequential stabilization mechanism, *J. Mol. Biol.*, **359**, 1410-1419, doi: 10.1016/ j.jmb.2006.04.035.
- Assfalg, M., Bertini, I., Dolfi, A., Turano, P., Mauk, A. G., Rosell, F. I., and Gray, H. B. (2003) Structural model for an alkaline form of ferricytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 2913-2922, doi: 10.1021/ja027180s.
- Amacher, J. F., Zhong, F., Lisi, G. P., Zhu, M. Q., Alden, S. L., et al. (2015) A compact structure of cytochrome *c* trapped in a lysine-ligated state: loop refolding and functional implications of a conformational switch, *J. Am. Chem. Soc.*, **137**, 8435-8449, doi: 10.1021/jacs.5b01493.
- 27. Davis, L. A., Schejter, A., and Hess, G. P. (1974) Alkaline isomerization of oxidized cytochrome *c*. Equilibrium and kinetic measurements, *J. Biol. Chem.*, **249**, 2624-2632.
- Gadsby, P. M., Peterson, J., Foote, N., Greenwood, C., and Thomson, A. J. (1987) Identification of ligand-exchange process tn the alkaline transition of horse cytochrome *c*, *Biochem. J.*, 246, 43-54, doi: 10.1042/bj2460043.
- 29. Nelson, C. J., and Bowler, B. E. (2000) pH dependence of formation of a partially unfolded state of a Lys $73 \rightarrow$ His variant of iso-1-cytochrome *c*: implications for the alkaline conformational transition of cytochrome *c*, *Biochemistry*, **39**, 13584-13594, doi: 10.1021/bi0017778.
- Hoang, L., Maity, H., Krishna, M. M. G., Lin, Y., and Englander, S. W. (2003) Folding units govern the cytochrome *c* alkaline transition, *J. Mol. Biol.*, **331**, 37-43, doi: 10.1016/s0022-2836(03)00698-3.
- Weinkam, P., Zimmermann, J., Sagle, L. B., Matsuda, S., Dawson, P. E., Wolynes, P. G., and Romesberg, F. E. (2008) Characterization of alkaline transitions in ferricytochrome *c* using carbon-deuterium infrared probes, *Biochemistry*, **47**, 13470-13480, doi: 10.1021/bi801223n.
- Hartshorn, R. T., and Moore, G. R. (1989) A denaturation-induced proton-uptake study of horse cytochrome c, *Biochem. J.*, 258, 595-598, doi: 10.1042/bj2580595.
- Rosell, F. I., Harris, T. R., Hildebrand, D. P., Döpner, S., Hildebrandt, P., and Mauk, A. G. (2000) Characterization of an alkaline transition intermediate stabilized in the Phe82Trp variant of yeast iso-1-cytochrome c, *Biochemistry*, **39**, 9047-9054, doi: 10.1021/bi001095k.
- Silkstone, G. G., Cooper, C. E., Svistunenko, D., and Wilson, M. T. (2005) EPR and optical spectroscopic studies of Met80X mutants of yeast ferricytochrome *c*. Models for inter-mediates in the alkaline transition, *J. Am. Chem Soc.*, **127**, 92-99, doi: 10.1021/ja045719b.
- Verbaro, D., Hagarman, A., Soffer, J., and Schweitzer-Stenner, R. (2009) The pH dependence of the 695 nm charge transfer band reveals the population of an intermediate state of the alkaline transition of ferricytochrome *c* at low ion concentrations, *Biochemistry*, 48, 2990-2996, doi: 10.1021/bi802208f.
- Bai, Y., Sosnick, T. R., Mayne, L., and Englander, S. W. (1995) Protein folding intermediates: native state hydrogen exchange, *Science*, **269**, 192-197, doi: 10.1126/science.7618079.
- Godbole, S., and Bowler, B. E. (1999) Effect of pH on formation of a nativelike intermediate on the unfolding pathway of a Lys 73→His variant of yeast iso-1-cytochrome *c*, *Biochemistry*, 38, 487-495, doi: 10.1021/bi981698k.

- Nelson, C. J., LaConte, M. J., and Bowler, B. E. (2001) Direct detection of heat and cold denaturation for partial unfolding of a protein, *J. Am. Chem. Soc.*, **123**, 7453-7454, doi: 10.1021/ja016144a.
- Weber, C., Michael, B., and Bosshard, H. R. (1987) Spectroscopic analysis of the cytochrome *c* oxidase-cytochrome *c* complex: circular dichroism and magnetic circular dichroism measurements reveal change of cytochrome c heme geometry imposed by complex formation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84, 6687-669, doi: 10.1073/pnas.84.19.6687.
- Jemmerson, R., Liu, J., Hausauer, D., Lam, K. P., Mondino, A., and Nelson, R. D. (1999) A conformational change in cytochrome c of apoptotic and necrotic cells is detected by monoclonal antibody binding and mimicked by association of the native antigen with synthetic phospholipid vesicles, *Biochemistry*, **38**, 3599-3609, doi: 10.1021/bi9809268.
- Abriata, L. A., Cassina, A., Tortora, V., Marin, M., Souza, J. M., et al. (2009) Nitration of solvent-exposed tyrosine 74 on cytochrome c triggers heme iron-methionine 80 bond disruption. Nuclear magnetic resonance and optical spectroscopy studies, *J. Biol. Chem.*, 284, 17-26, doi: 10.1074/ jbc.M807203200.
- Santucci, R., Sinibaldi, F., Patriarca, A., Santucci, D., and Fiorucci, L. (2010) Misfolded proteins and neurodegeneration: role of non-native cytochrome *c* in cell death, *Expert Rev. Proteomics*, 7, 507-5017, doi: 10.1586/epr.10.50.
- Josephs, T. M., Liptak, M. D., Hughes, G., Lo, A., Smith, R. M., et al. (2013) Conformational change and human cytochrome *c* function: mutation of residue 41 modulates caspase activation and destabilizes Met-80 coordination, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 18, 289-297, doi: 10.1007/s00775-012-0973-1.
- 44. Liptak, M. D., Fagerlund, R. D., Ledgerwood, E. C., Wilbanks, S. M., and Bren, K. L. (2011) The proapoptotic G41S mutation to human cytochrome *c* alters the heme electronic structure and increases the electron selfexchange rate, *J. Am. Chem. Soc.*, 133, 1153-1155, doi: 10.1021/ja106328k.
- 45. Karsisiotis, A. I., Deacon, O. M., Wilson, M. T., Macdonald, C., Blumenschein, T. M. A., et al. (2016) Increased dynamics in the 40-57 Ω-loop of the G41S variant of human cytochrome *c* promote its pro-apoptotic conformation, *Sci. Rep.*, 6, 30447, doi: 10.1038/srep30447.
- 46. De Rocco, D., Cerqua, C., Goffrini, P., Russo, G., Pastore, A., et al. (2014) Mutations of cytochrome *c* identified in patients with thrombocytopenia THC4 affect both apoptosis and cellular bioenergetics, *Biochim. Biophys. Acta*, **1842**, 269-274, doi: 10.1016/j.bbadis.2013.12.002.
- 47. Garcia-Heredia, J. M., Diaz-Quintana, A., Salzano, M., Orzaez, M., Perez-Paya, E., et al. (2011) Tyrosine phosphorylation turns alkaline transition into a biologically relevant process and makes human cytochrome *c* behave as an ant-apoptotic switch, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **16**, 1155-1168, doi: 10.1007/s00775-011-0804-9.
- Capdevila, D., Alvarez-Paggi, D., Castro, M., Tortora, V., Demicheli, V., et al. (2014) Coupling of tyrosine deprotonation and axial ligand exchange in nitrocytochrome *c*, *Chem. Commun.*, **50**, 2592-2594, doi: 10.1039/c3cc47207h.
- Josephs, T. M., Morison, I. M., Day, C. L., Wilbanks, S. M., and Ledgerwood, E. C. (2014) Enhancing the peroxidase activity of cytochrome c by mutation of residue 41: implications for peroxidase mechanism any cytochrome c release, *Biochem. J.*, 458, 259-265, doi: 10.1042/ BJ20131386.
- Diederix, R. E., Ubbink, M., and Canters, G. W. (2001) The peroxidase activity of cytochrome *c*-550 from *Paracoccus versutus, Eur. J. Biochem.*, 268, 4207-4216, doi: 10.1046/j.1432-1327.2001.02335.x.

- Diederix, R. E., Ubbink, M., and Canters, G. W. (2002) Peroxidase activity as a tool for studying the folding of *c*type cytochromes, *Biochemistry*, **41**, 13067-13077, doi: 10.1021/bi0260841.
- McClelland, L. J., Mou, T.-Ch., Jeakins-Cooley, M. E., Sprang, S. R., and Bowler, B. E. (2014) Structure of mitochondrial cytochrome *c* conformer competent for peroxidase activity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 6648-6653, doi: 10.1073/pnas.1323828111.
- 53. Battistuzzi, G., Borsari, M., Sola, M., and Francia, F. (1997) Redox thermodynamics of the native and alkaline forms of eukaryotic and bacterial class I cytochrome *c*, *Biochemistry*, **36**, 16247-16258, doi: 10.1021/bi971535g.
- 54. Millo, D., Bonifacio, A., Raineri, A., Borsari, M., Gooijer, C, and Van Der Zwan, G. (2007) pH-induced changes in absorbed cytochrome *c*. Voltammetric and surfaceenhanced resonance Raman characterization performed simultaneously at chemically modified silver electrodes, *Langmuir*, 23, 9898-9904, doi: 10.1021/la701751r.
- 55. Capdevila, D. A., Oviedo Rouco, S., Tomasina, F., Torora, V., Demicheli, V., et al. (2015) Active site structure and peroxidase activity of oxidatively modified cytochrome c species in complexes with cardiolipin, *Biochemistry*, **54**, 7491-7504, doi: 10.1021/acs.biochem.5b00922.
- Deacon, O. M., Karsisiotis, A. I., Moreno-Chicano, T., Hough, M. A., Macdonald, C., et al. (2017) Heightened dynamics of the oxidized Y48H variant of human cytochrome c increases its peroxidatic activity, *Biochemistry*, 56, 6111-6124, doi: 10.1021/acs.biochem. 7b00890.
- 57. Tomášková, N., Varhač, R., Lysáková, V., Musatov, A., and Sedlák, E. (2018) Peroxidase activity of cytochrome *c* in its compact state depends on dynamics of the heme region, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, **1866**, 1073-1083, doi: 10.1016/j.bbapap.2018.09.003.
- Žoldák, G., Sprinzl, M., and Sedlák, E. (2004) Modulation of activity of NADH oxidase from Thermus thermophilus through change in flexibility in the enzyme active site induced by Hofmeister series anions, *Eur. J. Biochem.*, **271**, 48-57, doi: 10.1046/j.1432-1033. 2003.03900.x.
- Dér, A., Kelemen, L., Fábián, L., Taneva, S. G., Fodor, E., et al. (2007) Interfacial water structure controls protein conformation, *J. Phys. Chem. B.*, **111**, 5344-5350, doi: 10.1021/jp066206p.
- doi: 10.1021/jp066206p.
 60. Varhač, R., Tomášková, N., Fabián, M., and Sedlák, E. (2009) Kinetics of cyanide binding as a probe of local stability/flexibility of cytochrome *c*, *Biophys. Chem.*, 144, 21-26, doi: 10.1016/j.bpc.2009.06.001.
- 61. Bogár, F., Bartha, F., Násztor, Z., Fábián, L., Leitgeb, B., and Dér, A. (2014) On the Hofmeister effect: fluctuations at the protein-water interface and the surface tension, *J. Phys. Chem. B.*, **118**, 8496-8504, doi: 10.1021/jp502505c.
- Tomášková, N., Varhač, R., Žoldák, G., Olekšáková, L., Sedláková, D., and Sedlák, E. (2007) Conformational stability and dynamics of cytochrome *c* affect its alkaline isomerization, *J. Biol. Inorg. Chem.*, **12**, 257-266, doi: 10.1007/s00775-006-0183-9.
- Garajová, K., Balogová, A., Dušeková, E., Sedláková, D, Sedlák, E., and Varhač, R. (2017) Correlation of lysozyme activity and stability in the presence of Hofmeister series anions, *Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteom.*, 1865, 281-288, doi: 10.1016/j.bbapap.2016.11.016.
- Dušeková, E., Garajová, K., Yavaşer, R., Varhač, R., and Sedlák, E. (2018) Hofmeister effect on catalytic properties of chymotrypsin is substrate-dependent, *Biophys. Chem.*, 243, 8-16, doi: 10.1016/j.bpc.2018.10.002.
- 65. Lemon, H. W. (1947) The effect of alkali on the ultraviolet absorption spectra of hydroxyaldehydes, hydroxyketones,

and other phenolic compounds, J. Am. Chem. Soc., 69, 2998-3000, doi: 10.1021/ja01204a018.

- 66. Myers, J. K., Pace, C. N., and Scholtz, J. M. (1995) Denaturant m values and heat capacity changes: relation to changes in accessible surface areas of protein unfolding, *Protein Sci.*, **4**, 2138-2148.
- 67. Santoro, M. M., and Bolen, D. W. (1988) Unfolding free energy changes determined by the linear extrapolation method. 1. Unfolding of phenylmethanesulfonyl alphachymotrypsin using different denaturants, *Biochemistry*, 27, 8063-8068, doi: 10.1021/bi00421a014.
- URL: https://www.3ds.com/products-services/biovia/ (Dassault Systems BIOVIA; Discovery Studio Client; San Diego, USA (2020) Dassault Systems BIOVIA; Discovery Studio 2020 Client; San Diego, USA.)
- Bushnell, G. W., Louie, G. V., and Brayer, G. D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.*, **214**, 585-595, doi: 10.1016/ 0022-2836(90)90200-6.
- Bowers, K. J., Sacerdoti, F. D., Salmon, J. K., Shan, Y., Shaw, D. E., et al. (2006) Molecular dynamics – Scalable algorithms for molecular dynamics simulations on commodity clusters, *Proceedings of the 2006 ACM/IEEE conference on Supercomputing - SC '06*, ACM Press.
- Berendsen, H. J. C., Grigera, J. R., and Straatsma, T. P. (1987) The missing term in effective pair potentials, *J. Phys. Chem.*, 91, 6269-6271, doi: 10.1021/j100308a038.
- Jorgensen, W. L., and Tirado-Rives, J. (1988) The OPLS [optimized potentials for liquid simulations] potential functions for proteins, energy minimizations for crystals of cyclic peptides and crambin, J. Am. Chem. Soc., 110, 1657-1666, doi: 10.1021/ja00214a001.
- Jorgensen, W. L., Tirado-Rives, J. (2005) Potential energy functions for atomic-level simulations of water and organic and biomolecular systems, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 6665-6670, doi: 10.1073/pnas.0408037102.
- 74. Masood, T. B., Sandhya, S., Chandra, N., and Natarajan, V. (2015) CHEXVIS: a tool for molecular channel extraction and visualization, *BMC Bioinformatics*, **16**, 119.
- 75. Baldwin, R. L. (1996) How Hofmeister ion interactions affect protein stability, *Biophys. J.*, **71**, 2056-2063, doi: 10.1016/S0006-3495(96)79404-3.
- Russell, B. S., and Bren, K. L. (2002) Denaturant dependence of equilibrium unfolding intermediates and denatured state structure of horse ferricytochrome *c*, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 7, 909-916, doi: 10.1007/s00775-002-0381-z.
 Tsong, T. Y. (1974) The Trp-59 fluorescence of ferricy-
- 77. Tsong, T. Y. (1974) The Trp-59 fluorescence of ferricytochrome *c* as a sensitive measure of the over-all protein conformation, *J. Biol. Chem.*, **249**, 1988-1990.
- Oviedo-Rouco, S., Perez-Bertoldi, J. M., Spedalieri, C, Castro, M. A., Tomasina, F., et al. (2020) Electron transfer and conformational transitions of cytochrome *c* are modulated by the same dynamical features, *Arch. Biochem. Biophys.*, 680, 108243, doi: 10.1016/j.abb.2019.108243.
- Theorell, H., and Åkesson, Å. (1941) Studies on cytochrome c. II. The optical properties of pure cytochrome c and some of its derivatives, J. Am. Chem. Soc., 63, 1804-1811, doi: 10.1021/ja01852a005.
- Barker, P. D., and Mauk, A. G. (1992) pH-Linked conformational regulation of a metalloprotein oxidation-reduction equilibrium: electrochemical analysis of the alkaline form of cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **114**, 3619-3624, doi: 10.1021/ja00036a006.
- 81. Lambeth, D. O., Campbell, K. L., Zand, R., and Palmer, G. (1973) The appearance of transient species of cytochrome c upon rapid oxidation or reduction at alkaline pH, *J. Biol. Chem.*, **248**, 8130-8136.
- 82. Deacon, O. M., White, R. W., Moore, G. R., Wilson, M. T., and Worrall, J. A. R. (2020) Comparison of the

structural dynamic and mitochondrial electron-transfer properties of the proapoptotic human cytochrome *c* variants, G41S, Y48H and A51V, *J. Inorg. Biochem.*, **203**, 110924, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2019.110924.

- Deacon, O. M., Svistusenko, D. A., Moore, G. R., Wilson, M. T., and Worrall, J. A. R. (2018) Naturally occurring disease-related mutations in the 40-57 Ω-loop of human cytochrome *c* control triggering of the alkaline isomerization, *Biochemistry*, 57, 4276-4288, doi: 10.1021/acs. biochem.8b00520.
- Guerra-Castellano, A., Díaz-Quintana, A., Moreno-Beltrán, B., López-Prados, J., Nieto, P. M., et al. (2015) Mimicking tyrosine phosphorylation in human cytochrome *c* by the evolved tRNA synthetase technique, *Chemistry*, **21**, 15004-15012, doi: 10.1002/chem. 201502019.
- Tsai, M. Y., Morozov, A. N., Chu, K. Y., and Lin, S. H. (2009) Molecular dynamics insight into the role of tertiary (foldon) interactions on unfolding in cytochrome *c*, *Chem. Phys. Lett.*, **475**, 111-115, doi: 10.1016/j.cplett.2009. 05.027.
- George, P., and Tsou, C. L. (1952) Reaction between hydrocyanic acid, cyanide ion and ferricytochrome *c*, *Biochem. J.*, **50**, 440-448, doi: 10.1042/bj0500440.
- 87. Sutin, N., and Yandell, J. K. (1972) Mechanisms of the reactions of cytochrome *c*. Rate and equilibrium constants for ligand binding to horse heart ferricytochrome *c*, *J. Biol. Chem.*, **247**, 6932-6936.
- Dumortier, C., Meyer, T. E., and Cusanovich, M. A. (1999) Protein dynamics: imidazole binding to class I *C*type cytochromes, *Arch Biochem Biophys.*, **371**, 142-148, doi: 10.1006/abbi.1999.1440.
- Tomášková, N., Varinská, L., and Sedlák, E. (2010) Rate of oxidative modification of cytochrome c by hydrogen peroxide is modulated by Hofmeister anions, *Gen. Physiol. Biophys.*, 29, 254-264, doi: 10.4149/gpb_2010_03_255.
- Pearce, L. L., Gärtner, A. L., Smith, M., and Mauk, A. G. (1989) Mutation-induced perturbation of the cytochrome *c* alkaline transition, *Biochemistry*, 28, 3152-3156, doi: 10.1021/bi00434a006.
- Nall, B. T., Zuniga, E. H., White, T. B., Wood, L. C., and Ramdas, L. (1989) Replacement of a conserved proline and the alkaline conformational change in iso-2cytochrome c, *Biochemistry*, 28, 9834-9839, doi: 10.1021/ bi00451a043.
- Sinibaldi, F., Piro, M. C., Howes, B. D., Smulevich, G., Ascoli, F., and Santucci, R. (2003) Rupture of the hydrogen bond linking two Omega-loops induces the molten globule state at neutral pH in cytochrome *c*, *Biochemistry*, 42, 7604-7610, doi: 10.1021/bi034132r.
- Baddam, S., and Bowler, B. E. (2006) Mutation of asparagine 52 to glycine promotes the alkaline form of iso-1-cytochrome c and causes loss of cooperativity in acid unfolding, *Biochemistry*, 45, 4611-4619, doi: 10.1021/ bi0524971.
- 94. Taler, G., Schejter, A., Navon, G., Vig, I., and Margoliash, E. (1995) The nature of the thermal equilibrium affecting the iron coordination of ferric cytochrome *c*, *Biochemistry*, **34**, 14209-14212, doi: 10.1021/bi00043a027.
- 95. Banci, L., Bertini, I., Spyroulias, G. A., and Turano, P. (1998) The conformational flexibility of oxidized cytochrome *c* studied through its interaction with NH3 and at high temperatures, *Eur. J. Inorg. Chem.*, **1998**, 583-591.
- Varhač, R., Sedláková, D., Stupák, M., and Sedlák, E. (2015) Non-two-state thermal denaturation of ferricytochrome *c* at neutral and slightly acidic pH values, *Biophys. Chem.*, 203-204, 41-50, doi: 10.1016/j.bpc.2015.05.002.
- 97. Dragomir, I., Hagarman, A., Wallace, C., and Schweitzer-Stenner, R. (2007) Optical band splitting and electronic

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

perturbations of the heme chromophore in cytochrome *C* at room temperature probed by visible electronic circular dichroism spectroscopy, *Biophys. J.*, **92**, 989-998, doi: 10.1529/biophysj.106.095976.

- Shah, R., and Schweitzer-Stenner, R. (2008) Structural changes of horse heart ferricytochrome *c* induced by changes of ionic strength and anion binding, *Biochemistry*, 47, 5250-5257, doi: 10.1021/bi702492n.
- 99. Schweitzer-Stenner, R., Shah, R., Hagarman, A., and Dragomir, I. (2007) Conformational substates of horse heart cytochrome *c* exhibit different thermal unfolding of the heme cavity, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 9603-9607, doi: 10.1021/jp069022j.
- 100. Maity, H., Maity, M., and Englander, S. W. (2004) How cytochrome *c* folds, and why: submolecular foldon units and their stepwise sequential stabilization, *J. Mol. Biol.*, 343, 223-233, doi: 10.1016/j.jmb.2004.08.005.
- 101. Hu, W., Kan, Z. Y., Mayne, L., and Englander, S. W. (2016) Cytochrome *c* folds through foldon-dependent native-like intermediates in an ordered pathway, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, **113**, 3809-3814, doi: 10.1073/pnas.1522674113.
- 102. Dickerson, R. E., Takano, T., Eiseberg, D., Kallai, O. B., Samson, L., Cooper, A., and Margoliash, E. (1971) Ferricytochrome c. I. General features of the horse and bonito proteins at 2.8 Å resolution, J. Biol. Chem., 246, 1511-1535.
- 103. Louie, G. V., Hutcheon, W. L., and Brayer, G. D. (1988) Yeast iso-1-cytochrome c. A 2.8 Å resolution three-dimensional structure determination, J. Mol. Biol., 199, 295-314, doi: 10.1016/0022-2836(88)90315-4.
- 104. Levin, Ö. (1963) Electron micrographs of bovine cytochrome c, J. Mol. Biol., 6, 137-140, doi: 10.1016/ S0022-2836(63)80129-1.
- 105. Margoliash, E., Needleman, S. B., and Stewart, J. W. (1963) A comparison of the amino acid sequences of the cytochrome *c* of several vertebrates, *Acta Chem. Scand.*, 17, S250-S256.
- 106. Zand, R., and Vinogradov, S. (1968) Circular Dichroism Studies II. The far ultraviolet circular dichroism of cytochrome c, Arch. Biochem. Biophys., 125, 94-97, doi: 10.1016/0003-9861(68)90642-5.
- 107. Margoliash, E., Schejter, A. (1966) Cytochrome c, Adv. Protein Chem., 21, 113-286, doi: 10.1016/s0065-3233(08)60128-x.
- 108. Takano, T., and Dickerson, R. E. (1981) Conformation change of cytochrome c. I. Ferricytochrome c refinement at 1.8 Å and comparison with the ferrocytochrome structure, J. Mol. Biol., 153, 95-115, doi: 10.1016/0022-2836(81)90529-5.
- Berghuis, A. M., and Brayer, G. D. (1992) Oxidation statedependent conformational changes in cytochrome *c*, *J. Mol. Biol.*, **223**, 959-976, doi: 10.1016/0022-2836(92)90255-i.
- 110. Lei, H., Bowler, B. E. (2019) Naturally occurring A51V variant of human cytochrome *c* destabilizes the native state and enhances peroxidase activity, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 8939-8953, doi: 10.1021/acs.jpcb.9b05869.
- 111. Harbury, H. A., Cronin, J. R., Fanger, M. W., Hettinger, T. P., Murphy, A. J., et al. (1965) Complex formation between methionine and a heme peptide from cytochrome *c*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **54**, 1658-1664, doi: 10.1073/pnas.54.6.1658.
- 112. Wilgus, H., and Stellwagen, E. (1974) Alkaline isomerization of ferricytochrome c: identification of the lysine ligand, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **71**, 2892-2894, doi: 10.1073/pnas.71.7.2892.
- 113. Brautigan, D. L., Feinberg, B. A., Hoffman, B. M., Margoliash, E., Preisach, J., and Blumberg, W. E. (1977) Multiple low spin forms of the cytochrome *c* ferrihe-

mochrome. EPR spectra of various eukaryotic and prokaryotic cytochromes *c*, *J. Biol. Chem.*, **252**, 574-582.

- 114. Ferrer, J. C., Guillemette, J. G., Bogumil, R., Inglis, S. C., Smith, M., and Mauk, A. G. (1993) Identification of Lys79 as an iron ligand in one form of alkaline state yeast iso-1cytochrome *c*, *J. Am. Chem. Soc.*, **115**, 7507-7508, doi: 10.1021/ja00069a062.
- 115. Moore, G. R., and Williams, R. J. P. (1977) Structural basis for the variation in redox potential of cytochromes, *FEBS Lett.*, **79**, 229-232, doi: 10.1016/0014-5793(77)80793-x.
- 116. Eaton, W. A., and Hochstrasser, R. M. (1967) Electric spectrum of single crystals of ferricytochrome c, J. Chem. Phys., 46, 2533-2539, doi: 10.1063/1.1841081.
- 117. Pettigrew, G. W., and Moore, G. R. (1987) Cytochromes c Biological Aspects, Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, doi: 10.1007/978-3-642-72698-9.
- 118. Brandt, K. G., Parks, P. C., Czerlinski, G. H., and Hess, G. P. (1966) On the elucidation of the pH dependence of the oxidation-reduction potential of cytochrome *c* at alkaline pH, *J. Biol. Chem.*, **241**, 4180-4185.

- 119. Paul, K. G. (1947) Oxidation-reduction potential of cytochrome c, Arch. Biochem., 12, 441-450.
- 120. Henderson, R. W., and Rawlinson, W. A. (1956) Oxidation-reduction potential od modified cytochrome c, *Nature*, 177, 1180-1181, doi: 10.1038/1771180b0.
- 121. Theodorakis, J. L., Garber, E. A., McCracken, J., Peisach, J., Schejter, A., and Margoliash, E. (1995) A chemical modification of cytochrome-*c* lysines leading to changes in heme iron ligation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1252**, 103-113, doi: 10.1016/0167-4838(95)00097-e.
- 122. Lemberg, R., and Barrett, J. (1973) *Cytochromes*, Academic Press, New York.
- Rodkey, F. L., and Ball, E. G. (1950) Oxidation-reduction potentials of the cytochrome *c* system, *J. Biol. Chem.*, 182, 17-28.
- 124. Shejter, A., Luntz, T. L., Koshy, T. I., and Margoliash, E. (1992) Relationship between local and global stabilities of proteins: site-directed mutants and chemically-modified derivatives of cytochrome *c*, *Biochemistry*, **31**, 8336-8343, doi: 10.1021/bi00150a030.

ANIONS SPECIFIC EFFECTS ON ALKALINE STATE OF CYTOCHROME c

E. Sedlák^{1,2}, T. Kožár², R. Varhač¹, A. Musatov³, and N. Tomášková^{1*}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Science, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia; E-mail: natasa.tomaskova@upjs.sk

² Centre for Interdisciplinary Biosciences, P. J. Šafárik University, 04154 Košice, Slovakia

³ Department of Biophysics, Institute of Experimental Physics, Slovak Academy of Sciences, 04001 Košice, Slovakia

Specific effects of anions on the structure, thermal stability, and peroxidase activity of native (state III) and alkaline (state IV) cytochrome c (cyt c) have been studied by the UV-VIS absorbance spectroscopy, intrinsic tryptophan fluorescence, and circular dichroism. Thermal and isothermal denaturation monitored by the tryptophan fluorescence and circular dichroism, respectively, implied lower stability of cyt c state IV in comparison with the state III. The pK_a value of alkaline isomerization of cyt c depended on the present salts, i.e., kosmotropic anions increased and chaotropic anions decreased pK_a (Hofmeister effect on protein stability). The peroxidase activity of cyt c in the state III, measured by oxidation of guaiacol, showed clear dependence on the salt position in the Hofmeister series, while cyt c in the alkaline isomerization of cyt c in the presence of 8 M urea, measured by Trp59 fluorescence, implied an existence of a high-affinity non-native ligand for the heme iron even in a partially denatured protein conformation. The conformation of the cyt c alkaline state in 8 M urea was considerably modulated by the specific effect of anions. Based on the Trp59 fluorescence quenching upon titration to alkaline pH in 8 M urea and molecular dynamics simulation, we hypothesize that the Lys79 conformer is most likely the predominant alkaline conformer of cyt c in the alkaline state.

Keywords: alkaline isomerization, Hofmeister anions, pseudo-peroxidase activity

УДК 577.152.123

ТЕРМОДИНАМИКА ФЕРРИЛЬНОЙ ФОРМЫ Р-ТИПА ЦИТОХРОМ *с*-ОКСИДАЗЫ БЫКА

© 2021 Л. Микулова¹, И. Пекова², Д. Янкура², М. Ступак³, М. Фабиан^{1*}

 ¹ Center for Interdisciplinary Biosciences, Technology and Innovation Park, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic; E-mail: marian.fabian@upjs.sk
 ² Department of Biophysics, Faculty of Science, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic
 ³ Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, 04011 Košice, Slovak Republic

> Поступила в редакцию 28.08.2020 После доработки 25.11.2020 Принята к публикации 25.11.2020

Во время восстановления молекулы O2 до H2O наблюдаются несколько феррильных состояний каталитического центра гема а₃-Си_в цитохром с-оксидазы (СсО) дыхательной цепи. Одна из феррильных форм Р-типа, Р_м, образуется в результате реакции двухэлектронного восстановленного СсО с О₂. В этом состоянии железо гема аз находится в феррильном состоянии. Также в каталитическом центре присутствует свободный радикал. Однако до сих пор экспериментально не установлена энергетика образования **P**_M. В настоящей ра-боте с помощью метода изотермической титрационной калориметрии и UV-Vis абсорбционной спектрофотометрии в оптическом диапазоне длин волн с примыкающей к нему ультрафиолетовой областью спектра было изучено образование состояния Р_М в реакции взаимодействия окисленной бычьей цитохром *с*-оксидазы (**0**) с одной молекулой H₂O₂. С помощью обоих методов были разделены две кинетические фазы, относящиеся к образованию P_M, и его эндогенная конверсия обратно в состояние O. Величина ΔН всего процесса (-66 ккал/моль H₂O₂) превышала значение выделившегося тепла (-50,8 ккал/моль O₂) в реакции восстановления O₂ ферроцитохромом *c* (pH 8,25 °C). Интересно, что значение ΔH (-32 ккал/моль феррильного состояния), представляющее первую фазу, намного превышает энтальпию образования Рм. Полученные данные показывают, что во время первой фазы радикал в состоянии Р_м фактически гасится и образуется спектрально аналогичная феррильная форма второго Р-типа (P_R). Кроме того, было показано, что вклад энтропии в изменения энергии Гиббса ($\Delta \hat{G} = -46$ ккал/моль O_2) во время каталитического восстановления молекулы O_2 ферроцитохромом *с* минимален (-0,7 кал/моль K).

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *с*-оксидаза, перекись водорода, феррильное состояние, калориметрия изотермического титрования.

DOI: 10.31857/S0320972521010073

введение

У аэробных организмов преобразование энергии происходит в дыхательных цепях, состоящих из организованных трансмембранных ферментативных комплексов. Терминальный комплекс в большинстве этих цепей принадлежит к суперсемейству гем-медных оксидаз (HCO, heme-copper oxidases), которые восстанавливают молекулярный кислород до воды. Это суперсемейство выделяется наличием низкоспинового гема и каталитического центра, состоящего из высокоспинового гема и иона меди [1, 2]. Кроме того, редокс-активный остаток

* Адресат для корреспонденции.

Туг локализуется очень близко к каталитическому центру фермента. Этот Туг ковалентно связан с одним His, связывающим ион меди в каталитическом центре фермента. НСО подразделяют на три подкласса: A, B и C. К оксидазам типа A относятся оксидазы цитохрома c (CcO) в митохондриях и некоторых типах бактерий. Гем-медные оксидазы B- и C-типа обнаружены только у бактерий и архей [1, 2].

Энергия, выделяемая оксидазой в процессе восстановления молекулы O_2 до воды, преобразуется в трансмембранный *протонный градиент*. Этот градиент создается двумя различными механизмами [3, 4]. Один механизм включает окисление цитохрома *с* на одной стороне мембраны (Р-сторона, митохондриальное межмембранное пространство или периплазма у бактерий) и потребление протонов для синтеза молекулы воды на другой стороне мембраны (N-сторона, митохондриальный матрикс или цитоплазма у бактерий). Второй механизм – это пе-

Принятые сокращения: СсО – цитохром *с*-оксидаза; c^{2+} – ферроцитохром *с*, восстановленный цитохром *с*; Fe_a – ион железа цитохрома *a*; Fe_{a3} – ион железа цитохрома *a*; Fe_{a3} – ион железа цитохрома *a*; HCO – гем-медные оксидазы; ITC – изотермическая титрационная калориметрия; KPi – калий-фосфатный буфер; TX – Triton X-100.

рекачка протонов, которая связывает окислительно-восстановительную реакцию (окислительные реакции) Ссо с трансмембранным переносом протонов с N- на P-сторону мембраны. Эффективность перекачки протонов зависит от типа HCO. В оксидазах А-типа на каждый электрон, перенесенный в каталитический центр фермента, в среднем накачивается один протон [3, 5]. Однако оксидазы В- и С-типа не столь эффективны и перекачивают H⁺ с более низкой стехиометрией [6, 7].

Митохондриальная СсО катализирует окисление ферроцитохрома с молекулярным кислородом. В СсО перенос электрона от ферроцитохрома с на O₂ облегчается четырьмя редоксцентрами: Cu_A , цитохром *a*, цитохром a_3 и Cu_B . Двуядерный центр меди Cu_A является первым акцептором электронов от ферроцитохрома с. Эти электроны быстро распределяются между Cu_A и ионом железа цитохрома *a* (Fe_a) [8–10]. Затем межбелковый перенос электронов продолжается от Fe_a на окисленный каталитический двуядерный центр гема a_3 -С u_B . В этом центре происходит восстановление кислорода до воды, а также ингибирование активности СсО экзогенными лигандами (например, цианидом и азидом).

Процесс восстановления O_2 осуществляется последовательностью спектрально различимых интермедиатов каталитического центра Fe_{a3} - Cu_B [4, 11, 12]. Наиболее загадочными и важными в процессе превращения энергии являются два вида феррильных интермедиатов: **Р** и **F** [13, 14]. Эти феррильные состояния образуются определенным числом электронов и протонов, поставляемых в каталитический центр фермента во время превращения O_2 в H_2O .

Восстановление O_2 начинается, когда оба металла в каталитическом центре находятся в восстановленном состоянии (**R**-состояние)

(рис. 1). Непосредственным продуктом этой реакции является первое феррильное состояние, в силу исторических причин называемое «peroxy» (**P**_M). Хотя всего два «внешних» электрона доступны для образования состояния Р_м, в действительности происходит четырехэлектронное восстановление О2. В результате этого восстановления происходит расщепление связи между атомами кислорода [15–17]. Один из двух дополнительных электронов, необходимых для четырехэлектронного восстановления О2, поступает от иона железа цитохрома a_3 (Fe_{a3}) [15, 17], а второй электрон, скорее всего – от Tyr244 (нумерация остатков по последовательности СсО быка) [18, 19], расположенного вблизи от каталитического центра.

Перенос другого электрона от цитохрома а в каталитические центры $\mathbf{P}_{\mathbf{M}}$ должен привести к восстановлению радикала Туг (YO') и образованию тирозината (YO⁻) [4, 19]. Поскольку феррильное состояние имеет те же спектральные характеристики, что и Р_м, оно было названо P_R [20, 21] (более подробно о различиях см. Einarsdóttir et al. [22]). Образование P_R сопровождается поглощением 2 H⁺ с N-стороны мембраны, и второй тип феррильного промежуточного продукта, тип F, производится без какого-либо переноса электронов. Один из двух абсорбированных протонов используется для образования воды в каталитическом центре Fe_{а3}-Си_в, а другой протон подлежит перекачке (рис. 1) [23-26]. Каталитический цикл завершается одноэлектронным восстановлением Fформы. Переход F-формы в окисленное состояние СсО (О) также сопровождается захватом двух протонов на N-стороне. И снова один H⁺ используется для синтеза воды, а второй – перекачивается [23-26].

Аналогичные феррильные интермедиаты были также идентифицированы в НСО В- и С-



Рис. 1. Предполагаемая структура феррильных интермедиатов каталитического центра, образующихся в ходе реакции восстановленной цитохром *с*-оксидазы с О₂

типа и даже в неканонических цитохром bd-оксидазах. Наличие форм P_M [27], P_R [28–30] и F [30] было показано для HCO B-типа, использующего ba_3 -оксидазу из *Thermus thermophilus*. Для семейства HCO C-типа вычислительные исследования, проведенные для *cbb3*оксидазы *Pseudomonas strutzeri*, показали, что состояние, эквивалентное P_M , является энергетически неблагоприятным, и оно не должно образовываться. Связь в молекуле кислорода разрывается на уровне феррильного интермедиата F-типа в тот момент, когда три внешних электрона и протона поступают в каталитический центр [31].

Феррильное состояние с π -катион-радикалом гема d (Fe_d⁴⁺ =O π ⁺) было обнаружено во время реакции полностью восстановленной bd-оксидазы с молекулой O₂ [32]. Эта форма аналогична соединению I пероксидазы хрена или **P**_M-форме бычьей СсО. Последующее одноэлектронное восстановление (Fe_d⁴⁺=O π ⁺) приводит к образованию феррильного состояния без образования радикала (Fe_d⁴⁺=O). Однако, по-видимому, состояние (Fe_d⁴⁺=O) π ⁺) не может являться физиологическим интермедиатом, поскольку оно не обнаруживается в стационарных условиях. Во время оборота bd-оксидазы определялись только феррильная (Fe_d⁴⁺=O) и феррооксо (Fe_d²⁺-O₂) формы [33, 34].

Несмотря на ключевую роль феррильных состояний в каталитическом центре и перекачивании протонов цитохром *с*-оксидазой, термодинамические характеристики их образования и взаимные превращения экспериментально не определены. В настоящей работе нами был использован метод изотермической титрационной калориметрии, чтобы определить энтальпию процесса образования состояния P_M в ходе реакции окисленной цитохром *с*-оксидазы с H_2O_2 . Кроме того, нами было показано, что каталитическое восстановление O_2 в СсО четырьмя молекулами ферроцитохрома *с* в основном обусловлено изменением энтальпии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реактивы. Hepes (4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid), Trizma (2-amino-2-(hydroxymethyl)-1,3-propanediol) и феррицианид калия («Sigma-Aldrich», США); Triton X-100 (TX) поступил от Roche Diagnostics («Roche», Швейцария); раствор перекиси водорода (~30%) («Fluka», США).

Цитохром *с*-оксидаза сердца быка была очищена из митохондрий с использованием ранее описанного метода [35] с небольшими измене-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

ниями в 10 мМ Tris-HCl, pH 7,6, 50 мМ K_2SO_4 и 0,1% (*w*/*v*) ТХ. Препарат очищенной CcO замораживали в жидком азоте и хранили при -80 °C. Концентрацию CcO определяли по спектру поглощения окисленного фермента в ближнем ультрафиолете и видимой области (UV-Vis), используя коэффициент экстинкции ε (424 нм), равный 156 мМ⁻¹·см⁻¹ [36].

Изотермическая титрационная калориметрия (ITC). Метод ITC был использован для определения значений энтальпии двух реакций. Первое значение — это Δ H окисления ферроцитохрома c (c^{2+}) молекулой O_2 , катализируемое СсО; второе — энтальпия образования феррильного состояния P_M в реакции между окисленной СсО (O) и H_2O_2 .

Энтальпию реакции окисления c^{2+} (21 мкМ) цитохром *с*-оксидазой (51 нМ) измеряли в насыщенном воздухом буфере (40 мМ калий-фосфатный буфер (КРі), рН 8,0, 0,1% (*w/v*) ТХ, 0,5 мкМ каталазы). Кювету ITC (0,2 мл) заполняли раствором восстановленного цитохрома *с* (c^{2+}), и запускали реакцию его окисления добавлением 2 мкл раствора цитохром *с*-оксидазы (5,22 мкМ) в течение 2 с. Цитохром *с* и цитохром *с*-оксидаза находились в одном и том же буфере. Значение энтальпии реакции определяли как отношение количества выделившего тепла (мккал) к количеству c^{2+} (моль) в кювете.

При измерении энтальпии образования формы P_M с помощью метода ITC очищенную CcO (150–250 мкМ) полностью окисляли при инкубации с 10 мМ феррицианида калия в течение 5 мин при комнатной температуре. Затем феррицианид калия удаляли при пропускании образцов через обессоливающую колонку PD-10 («Amersham Biosciences Inc.», Швеция), используя 40 мМ (KPi), pH 8,0, содержащий 0,1% TX. Этот препарат окисленной CcO далее использовали в измерениях ITC.

Образование P_M при ITC запускалось однократным введением 2,5 мкл H_2O_2 (431 мкМ) в течение 2 с в кювету (200 мкл), заполненную раствором окисленной СсО (54 мкМ). Как СсО, так и раствор перекиси водорода были приготовлены на одном и том же буфере (40 мМ КРі, рН 8,0, 0,1 % ТХ). Все измерения ITC проводили на приборе MicroCal ITC 200 («GE Healthcare», США) при 25 °C.

Кинетическая кривая реакции перекиси водорода с окисленной СсО состоит из двух фаз, относящихся к быстрому образованию P_M с последующим более медленным эндогенным переходом в состояние **О**. Чтобы определить количество выделенного тепла в первой фазе, образование феррильного состояния, вся кинетика ITC была разбита на кривую, представляющую образование P_M и кривую, представляющую его эндогенный распад (см. «Результаты исследования»). Поскольку площадь под кривой ITC представляет выделенную теплоту, то площадь под кривой первой фазы была определена путем интегрирования с использованием графической программы Igor («WaveMetrics», США). Тогда отношение этой теплоты к количеству феррильных форм ($P_M + F$), определенное в ходе параллельных измерений с помощью метода УФспектроскопии поглощения (UV-Vis), представляет изменения энтальпии для образования этих феррильных состояний.

Абсорбционная UV-Vis спектроскопия. Оценка реакции между окисленной формой CcO и H_2O_2 также была произведена с использованием спектрометра с диодной матрицей Specord S600 («Analytik Jena», Германия). После смешивания перекиси водорода и окисленной CcO каждые 10 с регистрировали спектры поглощения в диапазоне 400–700 нм. На основе накопленных спектров далее были получены данные кинетики спектральных изменений (ΔA 607–630 нм) и абсолютные спектры CcO в определенные моменты времени протекания реакции.

Несмотря на то, что подобранные экспериментальные условия благоприятствуют образованию состояния **Р**_м, реакция окисленной СсО с Н₂О₂ приводит также к образованию второго типа феррильной формы – состоянию F [37]. Состав продукта реакции, выраженный в виде концентраций P_M и F, можно определить по дифференциальному спектру поглощения UV-Vis [38]. Этот дифференциальный спектр был получен путем вычитания спектра исходной окисленной формы СсО из спектра СсО, обработанной H₂O₂. Концентрацию P_M рассчитывали по этому дифференциальному спектру с использованием $\Delta \varepsilon$ (607–630 нм) = 11 м M^{-1} ·см⁻¹ [12]. Общее количество СсО, вступившей в реакцию с H₂O₂, и сумму P_M и F определяли по тому же спектру с использованием $\Delta \varepsilon$ (438–413 нм) = 67 мМ⁻¹·см⁻¹ [38].

Приготовление реактивов. Приобретенный препарат H_2O_2 разводили деионизированной водой и определяли концентрацию полученного раствора по значению оптического поглощения при 240 нм с использованием ε (240 нм) = 40 мM⁻¹·см⁻¹ [39]. Из разведенного раствора перекиси водорода приготавливали аликвоты (100 мкл (431 мкМ) H_2O_2 в 40 мМ КРі, рН 8,0), которые замораживали в жидком азоте и хранили при –80 °С. Для проведения каждой реакции с СсО использовали новую аликвоту замороженного раствора H_2O_2 .

Ферроцитохром $c(c^{2+})$ получали восстановлением феррицитохрома $c(c^{3+})$ небольшим количеством сухого дитионита и последующим обессоливанием образца на колонке PD-10 («Amersham Biosciences Inc.», Швеция), уравновешенной 40 мМ КРі, рН 8,0. Концентрацию c^{2+} определяли по дифференциальному спектру: восстановленный *минус* окисленный цитохром *с* с использованием значения $\Delta \varepsilon$ (550–542 нм) = 20 мМ⁻¹·см⁻¹ [40].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Термодинамика каталитического оборота СсО. Как можно было ожидать, окисление ферроцитохрома $c(c^{2+})$ с помощью СсО сопровождается высвобождением теплоты (рис. 2). Об этом свидетельствуют отрицательные значения скорости нагрева, наблюдаемые после первого введения СсО в кювету ITC, заполненную c^{2+} . Последующее идентичное введение СсО после полного завершения окисления c^{2+} было использовано для определения комбинированной теплоты для смешивания, разведения и, возможно, для связывания окисленного цитохрома с с СсО. Величина поглощенной теплоты в этих контролях составляла ~3% от теплоты, высвобожденной в ходе окисления c^{2+} . Тем не менее это небольшое количество было добавлено к количеству теплоты, выделившегося в процессе окисления c^{2+} .



Рис. 2. Выделение теплоты во время оборота цитохром *с*оксидазы. Окисление ферроцитохрома *с* (21 мкМ) с помощью СсО (51 нМ) регистрировалось с использованием калориметра изотермического титрования при 25 °С. Две стрелки (СсО) показывают время введения 2 мкл окисленной СсО (5,22 мкМ) в реакционную кювету, заполненную цитохромом *с*. Использован буфер, содержащий 40 мМ КРі, рН 8,0, 0,1% ТХ и 0,5 мкМ каталазы

С этой поправкой была определена энтальпия реакции $\Delta H = -11,5 \pm 0,3$ ккал/моль c^{2+} .

Однако окисление одной молекулы c^{2+} молекулой O₂ связано с извлечением одного протона из фосфатного буфера для образования молекулы воды. Таким образом, значение $\Delta H = -11,5$ ккал/моль необходимо скорректировать с учетом энтальпии ионизации буфера ($\Delta H = +1,22$ ккал/моль) [41]. После этой корректировки энтальпия окисления c^{2+} молекулой O₂ составляет -12,7 ккал/моль c^{2+} (-0,55 эВ). Тогда $\Delta H - 50,8$ ккал/моль (-2,2 эВ) соответствует общему восстановлению O₂ четырьмя c^{2+} при рH 8,0 и 25 °C. $\Delta H = -16,7$ ккал/моль c^{2+} было определено в более ранних исследованиях с применением метода ITC в немного отличающихся условиях (рH 7,4, 23 °C) [41].

Определив ΔH , есть возможность рассчитать величину изменения энтропии реакции (ΔS) с помощью известной формулы расчета изменений энергии Гиббса ($\Delta G = \Delta H - T\Delta S$). Значение ΔG может быть рассчитано по формуле $\Delta G = -nxFx\Delta E_m$, где n -это число электронов, перенесенных в окислительно-восстановительной реакции (n = 4), F – это постоянная Фарадея (96 485 Дж/(моль В)) и ΔE_m представляет разность потенциалов средней точки между акцептором электронов (пара О₂/H₂O) и донором электронов (c^{3+}/c^{2+}). Пара O₂/H₂O имеет потенциал средней точки при рН 8,0, равный +755 мВ (Е_{т.8}) при летучести кислорода в 1 атм., что соответствует 1,2 мМ O₂ в растворе при 25 °C. Поскольку наши измерения были проведены в насыщенном воздухом буфере при концентрации О2 ~0,25 мМ, этот потенциал должен понизиться на 10 мВ [4]. Таким образом, в этих условиях (pH 8,0, 0,25 мМ O₂, 25 °C) потенциал средней точки пары О₂/H₂O составляет +745 мВ. Принимая во внимание значение +245 мВ для Е_т цитохрома с [40], значение ∆Е_т будет равно +500 мВ. Эта разница составляет ∆G ~46 ккал/моль О₂ (-2,0 эВ). Следовательно, вклад энтропии в энергию Гиббса будет равен всего +4,8 ккал/моль О₂ (~10%), что соответствует изменению энтропии ΔS = -0,7 кал/моль $^{-1}$ ·K $^{-1}$. Малая величина Δ S означает, что изменение энтальпии является основной движущей силой процесса восстановления молекулы O_2 ферроцитохромом *c*.

При физиологических условиях оборот цитохром *с*-оксидазы, погруженной в мембрану, связан с генерацией трансмембранного градиента H^+ . Этот градиент образуется в результате абсорбции протонов с одной стороны мембраны и их высвобождением на другой стороне мембраны. Наши данные предполагают, что формирование этого градиента обусловлено главным



Рис. 3. Получение феррильного состояния P_M цитохром *с*оксидазы в реакции с перекисью водорода: спектральные измерения. *a* – Кинетика образования и эндогенного распада P_M , образованного в реакции окисленной СсО (54 мкМ) с H_2O_2 (5,3 мкМ) при 25 °С. Стрелка (H_2O_2) показывает время добавления перекиси водорода. *b* – Дифференциальный спектр, полученный в результате вычитания спектра исходной окисленной СсО из спектра, полученного в тот момент времени (180 с), когда изменение величины поглощения ΔA (607–630 нм) достигло своего максимума. Состав буфера такой же, как указано на рис. 2

образом изменением энтальпии в ходе восстановления О₂.

Термодинамика феррильной формы Р_м**.** Взаимодействие окисленной СсО с одной молеку-



Рис. 4. Образование феррильного состояния Р_м цитохром с-оксидазы перекисью водорода: калориметрические измерения. а – Временная зависимость скорости тепловыделения после введения перекиси водорода (5,3 мкМ) в реакционную кювету с окисленной СсО (54 мкМ) при 25 °С. Пунктирная линия – измеренная кинетическая кривая полного тепловыделения. Сплошная линия - тепловыделение, связанное с образованием **Р**_м. *b* – Кинетическая кривая образования Рм, приведенная выше (сплошная линия) вместе со скоростью тепловыделения, наблюдаемой при реакции цианид-лигированного СсО с Н₂О₂ (пунктирная линия). Цианидный комплекс (54 мкМ CcO-CN) реагировал с 9,6 мкМ H₂O₂ в буфере, содержащем 2 мМ КСN. Стрелками (H₂O₂) показано время введения перекиси водорода (2,5 мкл в течение 2 с). Состав буфера такой же, как указано на рис. 2

лой H_2O_2 при щелочных значениях pH приводит к образованию феррильного состояния каталитического центра, которое эквивалентно форме P_M [38, 42]. Это процесс при pH 8,0 представлен на рис. 3, *a*, на котором ход реакции показан в виде изменения спектра поглощения ΔA (607–630 нм) с течением времени. Спектральные изменения происходили в двух различных фазах. Первоначальное увеличение значения ΔA (607–630 нм) после добавления 5,3 мкМ H_2O_2 к окисленной форме СсО (54 мкМ) отражает образование формы P_M . Затем P_M эндогенно распадается с образованием снова формы **O**. Этот переход, представленный снижением поглощения ΔA (607–630 нм), в данных условиях происходит в течение примерно одного часа.

Доминирующее образование состояния P_M подтверждено дифференциальными спектрами CcO (рис. 3, *b*). Эти спектры получали в результате вычитания спектра окисленной CcO из спектра, полученного в момент времени, когда значение ΔA (607–630 нм) достигло своего максимума (180 с после добавления H_2O_2).

По спектральному изменению полосы Соре было установлено, что всего 5,2 мкМ СсО вступило в реакцию с H_2O_2 (сумма концентраций P_M и F). По дифференциальному спектру ΔA (607–630 нм) установлено, что 4,7 мкМ СсО находится в состоянии P_M . Таким образом, продукт реакции состоит из двух феррильных форм [~90% формы P_M (4,7 мкМ) и ~10% формы F (0,5 мкМ)].

Эта реакция также была проведена на калориметре для изотермического титрования (рис. 4). Зависимость скорости тепловыделения от времени также показывает две фазы. Отрицательные значения скорости, которые наблюдались во время всего процесса в целом, показали, что тепло выделяется в обеих фазах. Общее количество выделившегося тепла, представленного площадью под всей кривой, составляет –66 ккал/моль H₂O₂.

Очевидно, быстрая фаза наблюдаемого процесса соответствует образованию феррильных состояний, а более медленная фаза – их возвращению результате распада в состояние О. Сразу после введения Н₂O₂, скорость тепловыделения возрастает до максимума, поскольку она пропорциональна скорости образования феррильных состояний, которая находится на максимуме в начале реакции. Следующее снижение между 60 и 180 с связано со снижением скорости образования этих феррильных форм. Если реакция останавливается на стадии образования феррильных состояний, то её скорость должна упасть от максимума до нуля в моноэкспоненциальном процессе. Однако такое резкое снижение не наблюдается, так как есть вклад второго процесса, связанного с выделением тепла в результате эндогенного распада феррильных состояний обратно в состояния О. Поэтому что-

бы получить кривую ITC, касающуюся только образования феррильных форм, данные кинетики в диапазоне 60–180 с были обработаны с помощью моноэкспоненциальной функции. Также была построена полная кривая, состоящая из двух сегментов, представляющая образование феррильных состояний в диапазоне от нуля до 3000 с. Первый сегмент представлял действительные данные ITC вплоть до 180 с. Второй сегмент включал данные, полученные в диапазоне 180–3000 с, и содержал данные моноэкспоненциальной функции.

Кривая ITC для образования $P_{\rm M}$ представлена в виде пунктирной линии на рис. 4. Площадь под этой кривой означает изменение энтальпии, равное -34,6 ккал/моль феррильных состояний в этом конкретном случае. Среднее значение, равное $-35,0 \pm 3,2$ ккал/моль феррильных состояний, было получено в результате трех независимых измерений с использованием двух различных препаратов CcO. Эта разница значения энтальпии представляет комбинированную теплоту образования $P_{\rm M}$ (~90%) и F (~10%).

Контрольные измерения ITC показали, что тепловыделение существенно ингибируется, если в реакции с H_2O_2 используется комплекс окисленной СсО с цианидом (СсО–СN) (рис. 4, *b*). Для цианид-лигированного СсО было определено изменение энтальпии, равное примерно –3,0 ккал/моль H_2O_2 . Таким образом, после вычитания этой неспецифической теплоты конечное изменение энтальпии $\Delta H = -32$ ккал/моль феррильных состояний обусловлено образованием феррильных состояний, а значение ΔH , равное –34 ккал/моль, соответствует их эндогенному превращению в **О**-состояние.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Феррильные интермедиаты, полученные реакцией окисленной СсО с Н₂О₂, часто используются для изучения естественных каталитических интермедиатов этого фермента [42-45]. В настоящей работе для получения феррильного состояния Р_м была использована реакция субстехиометрического количества Н₂O₂ с окисленной СсО при щелочных значения рН. Чтобы исключить множественные взаимодействия одной молекулы СсО с перекисью водорода, использовали низкие концентрации H₂O₂ относительно концентрации фермента. Как показывает измерение поглощения UV-Vis (рис. 3, b), после обработки перекисью водорода и образования феррильных форм СсО снова возвращается в полностью окисленное состояние.

Существует несколько предполагаемых структур каталитического центра в случае состояний P_M и F [4, 12, 45, 46]. Общую реакцию O с H_2O_2 в каталитическом центре можно проиллюстрировать следующей схемой:

 $\begin{array}{c} (\mathrm{Fe_{a3}}^{3+} \operatorname{HO-Cu_B}^{2+} \mathrm{YO}) + \mathrm{H_2O_2} \leftrightarrow (\mathrm{Fe_{a3}}^{3+} \text{-O-OH Cu_B}^{2+} \mathrm{YO}) + \mathrm{H_2O}, \, (\mathrm{A}) \\ \\ \mathbf{O} \qquad \mathbf{P_0} \end{array}$

(Fe_{a3}³⁺-O-OH Cu_B²⁺ YO) \rightarrow (Fe_{a3}⁴⁺=O HO-Cu_B²⁺ YO[•]), (B) IP PM

 $(Fe_{a3}^{4+}=O \text{ HO-Cu}_B^{2+} \text{ YO}^{\bullet}) + 2 \text{ H}^+ + 2e^- \rightarrow (Fe_{a3}^{3+} \text{ HO-Cu}_B^{2+} \text{ YO}) + H_2O, (C)$ **P**_M **O**

где первая стадия (A) — обратимое связывание H_2O_2 с окисленным каталитическим центром (интермедиат P_0) [12]. Этот комплекс очень нестабилен и в ходе окислительно-восстановительной реакции дает начало феррильной форме P_M и радикалу остатка Туг (YO[•]) (B). После двухэлектронного эндогенного восстановления P_M окисленный каталитический центр СсО регенерируется и пероксид полностью восстанавливается до воды (C).

Представленная выше схема общей реакции в каталитическом центре создает впечатление полного восстановления окисленной СсО. Однако ранее мы показали, что обработка СсО субмиллимолярными концентрациями H_2O_2 вызывает снижение её каталитической активности. Таким образом, внутренняя пероксидазная активность связана с необратимой модификацией СсО [47].

Изменение энтальпии для эндогенного восстановления H_2O_2 ($\Delta H = -66$ ккал/моль H_2O_2) (-2,9 эВ)) превышает значение энтальпии, определенной для общей реакции восстановления О₂ четырьмя молекулами ферроцитохромов ($\Delta H = -50,8$ ккал/моль O₂ (-2,2 эВ)). Большее абсолютное значение ДН, полученное в случае восстановления H₂O₂ до воды, скорее всего, является результатом участия в этих двух процессах различных доноров электронов. При эндогенном восстановлении Н₂O₂ конечные доноры электронов должны иметь более низкие потенциалы средней точки, чем у цитохрома с (+245 мВ). Например, остатки Cys [48] и Met с потенциалами средней точки около -250 мВ удовлетворяют этому требованию.

Из общего изменения энтальпии (-66 ккал/ моль H_2O_2) значение $\Delta H = -32 \text{ ккал}/$ моль прореагировавшей СсО ассоциировано с образованием двух феррильных состояний: P_M (90%) и **F** (10%). Меньшая фракция **F**, вероятно, обусловлена реакцией **P** со второй молекулой H_2O_2 [37, 42, 47, 49, 50]. Было высказано предположение, что превращение P_M , стимулируемое H_2O_2 , является окислительно-восстановительной реакцией (D) [51, 52]:

В этом случае происходит перенос атома водорода от H_2O_2 на радикал Туг244 и высвобождается супероксид. Теплоту, выделяющуюся при переносе атома водорода, можно рассчитать из разницы между значениями ΔH диссоциации связи H-O в H₂O₂ (~88 ккал/моль) и фенолах (~90 ккал/моль) [53]. Исходя из этих значений, перенос атома Н должен привести к высвобождению примерно –2 ккал/моль H₂O₂. Тогда вклад этого превращения в определяемое значение ΔH пренебрежительно мал (-0,2 ккал/моль), поскольку только 10% Р_м превращается в F. Следовательно, наблюдаемое значение ΔH (-32 ккал/моль прореагировавшей СсО) в основном представляет энтальпию, связанную с переходом из О-состояния в Р_М.

Значение ΔH (-32 ккал/моль для P_{M}) можно рассматривать как результат протекания, по крайней мере, двух процессов. Одним из них является обратимое связывание H₂O₂ с каталитическим центром Fe_{a3}-Cu_B и образование P₀. Второй процесс - это окислительно-восстановительная реакция. Насколько нам известно, пока нет экспериментальных данных по энтальпии реакции для какого-либо из этих двух процессов или энтальпии всей реакции СсО с H₂O₂. Однако теоретические рассчеты показали, что превращение Р₀ в Р_м-состояние должно быть связано с изменением энергии Гиббса менее чем на –10 ккал/моль [54, 55]. Так как предполагаемые изменения энтропии при этом переходе минимальны [56], значения ΔH и ΔG должны быть очень близки. Основываясь на этом допущении, величина ∆Н связывания перекиси водорода с окисленной СсО должна составлять -22 ккал/моль. Однако и знак, и величина этого ΔH не согласуется с опубликованными данными, полученными для связывания H₂O₂ с различными гемовыми белками. Измерения с использованием мутанта человеческого миоглобина (His64Gly) [57], Мп-восстановленного миоглобина [58], пероксидазы хрена при минусовых температурах [59] и Мп-восстановленной пероксидазы хрена [60] показали только положительные величины ΔH со значениями от нуля до +4 ккал/моль.

Чтобы устранить это несоответствие, мы предположили, что наблюдаемая большая величина ΔH (-32 ккал/моль P_M) включает в себя

также тепло, высвобождаемое в ходе нескольких дополнительных реакций. В результате многочисленных экспериментальных наблюдений можно предположить, что радикал Туг в каталитическом центре СсО, образующийся при реакции окисленной CcO с H_2O_2 , менее стабилен, чем феррильное состояние. Это предположение основано на наблюдениях различных типов и количеств свободных радикалов [38, 61-64], изучении миграции радикалов и модификации нескольких находящихся на удалении остатков Trp и связанных с ними фосфолипидов [65-67] при взаимодействии окисленного CcO с H_2O_2 . Кроме того, наше предыдущее исследование показало, что через несколько минут (~5 мин) после образования P_M при 4 °C большая часть радикалов (~70%) удаляется из каталитического центра [68].

Такое поведение радикала Tyr, обладающего меньшей стабильностью по сравнению с железом в феррильном состоянии, очень похоже на поведение первичных радикалов в миоглобинах [69–71], гемоглобинах [72_75], цитохром *с*пероксидазе [76], аскорбатпероксидазе [77], пероксидазе хрена [78] и простагландин Н-синтазе [79]. Поэтому мы пришли к выводу, что большая величина ΔH (-32 ккал/моль из P_M) является следствием комбинированной теплоты реакции образования состояния Р_м и миграции радикалов из каталитического центра Fe_{а3}-Cu_B, вероятно, также связанной с его тушением. Возможно, часть радикалов может быть восстановлена в результате обычного переноса электронов, поступивших из следов примесей в буферных растворах.

Радикал Туг также играет ключевую роль в некоторых предложенных механизмах перекачки протонов с участием CcO [4, 46, 80–82]. Каталитическое восстановление Туг[•] в цитохроме *а* приводит к состоянию P_R и должно обеспечить энергию для перемещения одного протона внутри белка к так называемой протонной ловушке или месту загрузки протонов [4, 83]. Можно предположить, что в отсутствие внешних доноров электронов, способность CcO перекачивать H⁺ за счет восстановления радикалов может быть утрачена через несколько минут после образования P_M . Эта потеря может быть следствием нефизиологического редокс-пути, который используется для аннигиляции радикалов Туг.

В целом это исследование показало, как с помощью абсорбционной спектроскопии UV-Vis, так и с помощью изотермической титрационной калориметрии, что переход окисленной бычьей цитохром *с*-оксидазы в феррильное состояние \mathbf{P}_{M} с помощью H_2O_2 сопровождается выделением большого количества тепла (—32 ккал/моль фер-

рильного состояния). Это составляет ~64% общего изменения ΔH , наблюдаемого при каталитическом восстановлении молекулы O₂ четырьмя ферроцитохромами *с*. Избыток выделенного тепла означает, что во время генерации формы **P**_M также протекают какие-то другие побочные реакции. На основании наших и других опубликованных данных, реакцию окисленной CcO с H₂O₂ можно обобщить следующей схемой (E):

где действительно образуются два феррильных состояния **Р**-типа, $\mathbf{P}_{\mathbf{M}}$ и $\mathbf{P}_{\mathbf{R}}$, для которых характерны идентичные спектры в видимой области спектра. Сначала H_2O_2 вызывает образование феррильного железа и радикала в каталитическом центре ($\mathbf{P}_{\mathbf{M}}$). Однако в то время, когда эта форма окисленного железа **Р**-типа спектрально полностью развита, радикал уже мигрировал из каталитического центра и сформировалось состояние $\mathbf{P}_{\mathbf{R}}$. Эта миграция радикала и его вероятное тушение — очевидно, побочные реакции,

 Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. A (2001) Novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1505, 185-208.

- Sousa, F. L., Alves, R. J., Ribeiro, M. A., Pereira-Leal, J. B., Teixeira, M., et al. (2012) The superfamily of heme-copper oxygen reductases: types and evolutionary considerations, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 629-637.
- 3. Wikstrom, M. K. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273.
- Wikstrom, M., Krab, K., and Sharma, V. (2018) Oxygen activation and energy conservation by cytochrome c oxidase, *Chem. Rev.*, 118, 2469-2490.
- Kim, Y. C., Wikstrom, M., Hummer, G. (2007) Kinetic models of redox-coupled proton pumping, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104, 2169-2174.
 Rauhamaki, V., and Wikstrom, M. (2014) The causes of Coupled Coupl
- Rauhamaki, V., and Wikstrom, M. (2014) The causes of reduced proton-pumping efficiency in type B and C respiratory heme-copper oxidases, and in some mutated variants of type A, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, 1837, 999-1003.
- Han, H., Hemp, J., Pace, L. A., Ouyang, H., Ganesan, K., et al. (2011) Adaptation of aerobic respiration to low O₂ environments, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 14109-14114.
- Pan, L. P., Hibdon, S., Liu, R. Q., Durham, B., and Millett, F. (1993) Intracomplex electron transfer between ruthenium-cytochrome *c* derivatives and cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, 32, 8492-8498.
- Szundi, I., Cappuccio, J. A., Borovok, N., Kotlyar, A. B., and Einarsdottir, O. (2001) Photoinduced electron transfer in the cytochrome *c*/cytochrome *c* oxidase complex using thiouredopyrenetrisulfonate-labeled cytochrome *c* optical multichannel detection. *Biochemistry*, 40, 2186-2193.
- 10. Geren, L., Durham, B., and Millett, F. (2009) Use of ruthenium photoreduction techniques to study electron

которые вносят вклад в наблюдаемое изменение энтальпии в ходе реакции окисленной CcO с H_2O_2 .

Благодарности. Эта работа посвящается памяти А.А. Константинова, выдающегося ученого, вдохновляющего коллегу и дорогого друга.

Финансирование. Настоящая работа была выполнена в рамках проекта «Открытое научное сообщество для проведения современных междисциплинарных исследований в медицине» («Open scientific community for modern interdisciplinary research in medicine (OPENMED)-ITMS2014+: 313011V455»), проводимого Operational Program Integrated Infrastructure и финансируемого ERDF и Грантовым Агентством Словакии (Slovak Grant Agency) (VEGA 1/0464/18).

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

Соблюдение этических норм. В настоящей работе нет описания работ, выполненных авторами статьи и проведенных с участием людей или использованием в качестве объектов исследования лабораторных животных.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

transfer in cytochrome oxidase, *Method Enzymol.*, **456**, 507-520.

- Wikstrom, M. (2012) Active site intermediates in the reduction of O₂ by cytochrome oxidase, and their derivatives, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 468-475.
 Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome c oxidase:
- Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome c oxidase: Intermediates of the catalytic cycle and their energy-coupled interconversion, *FEBS Lett.*, 586, 630-639.
- Wikstrom, M. (1981) Energy-dependent reversal of the cytochrome oxidase reaction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 78, 4051-4054.
- 14. Wikstrom, M., and Morgan, J. E. (1992) The dioxygen cycle. Spectral, kinetic, and thermodynamic characteristics of ferryl and peroxy intermediates observed by reversal of the cytochrome oxidase reaction, *J. Biol. Chem.*, **267**, 10266-10273.
- Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock, G. T. (1998) Dioxygen activation and bond cleavage by mixedvalence cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 95, 8020-8025.
- Fabian, M., Wong, W. W., Gennis, R. B., and Palmer, G. (1999) Mass spectrometric determination of dioxygen bond splitting in the "peroxy" intermediate of cytochrome c oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 96, 13114-13117.
- Pinakoulaki, E., Daskalakis, V., Ohta, T., Richter, O. M., Budiman, K., et al. (2013) The protein effect in the structure of two ferryl-oxo intermediates at the same oxidation level in the heme copper binuclear center of cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, 288, 20261-20266.
- oxidase, J. Biol. Chem., 288, 20261-20266.
 Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock, G. T. (2000) Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, 290, 1588-1591.
- Gorbikova, E. A., Belevich, I., Wikstrom, M., and Verkhovsky, M. I. (2008) The proton donor for OO bond

scission by cytochrome c oxidase, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 105, 10733-10737.

- 20. Morgan, J. E., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (1996) Observation and assignment of peroxy and ferryl interme-diates in the reduction of dioxygen to water by bv cytochrome c oxidase, Biochemistry, 35, 12235-12240.
- 21. Björck, M. L., and Brzezinski, P. (2018) Control of transmembrane charge transfer in cytochrome c oxidase by the
- membrane potential, *Nat. Commun.*, 9, 1-8. Einarsdóttir, O., Szundi, I., Van Eps, N., and Sucheta, A. (2002) P_M and P_R forms of cytochrome *c* oxidase have dif-22 Ferent spectral properties, *J. Inorg. Bioch.*, **91**, 87-93. Belevich, I., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (2006)
- 23. Proton-coupled electron transfer drives the proton pump
- of cytochrome c oxidase, *Nature*, **440**, 829-832. Faxen, K., Gilderson, G., Ädelroth, P., and Brzezinski, P. A. (2005) Mechanistic principle for proton pumping by 24 cytochrome c oxidase, Nature, 437, 286-289.
- Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (2004) 25. The catalytic cycle of cytochrome c oxidase is not the sum of its two halves, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A, 101, 529-533.
- Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, J. E., and Wikstrom, M. (1999) Proton transloca-26.
- tion by cytochrome c oxidase, *Nature*, **400**, 480-483. Szundi, I., Funatogawa, C., Soulimane, T., and Einarsdóttir, O. (2020) The reactions of O_2 and NO with mixed-valence ba_3 cytochrome c oxidase from *Thermus* tharmophilus *B* indus *L* **119**, 286, 205 27.
- thermophilus, Biophys. J., 118, 386-395. Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikström, M., et al. (2007) Time-resolved single-28. turnover of ba_3 oxidase from Thermus thermophilus, Biochim. Biophys. Acta, 1767, 1383-1392.
- 29 Smirnova, I. A., Zaslavsky, D., Fee, J. A., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2008) Electron and proton transfer in the ba_3 oxidase from Thermus thermophilus, J. Bioenerg. Biomem., 40, 281-287.
- Poiana, F., von Ballmoos, C., Gonska, N., Blomberg, M. R. A., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2017) Splitting of the O–O bond at the heme-copper catalytic site of res-30. piratory oxidases, *Sci. Adv.*, **3**, e1700279. Blomberg, M. R. A. (2020) The mechanism for oxygen
- 31. reduction in the C family cbb3 cytochrome c oxidases implications for the proton pumping stoichiometry, J. Inorg. Biochem., 203, 11086.
- 32. Paulus, A., Rossius, S. G. H., 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. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome bd terminal oxidase 33. at steady-state: ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509. Borisov, V. B., and Siletsky, S. A. (2019) Features of orga-
- 34. nization and mechanism of catalysis of two families of terminal oxidases: heme-copper and bd-type, Biochemistry (Moscow), **84**, 1390-1402.
- 35. Soulimane, T., and Buse, G. (1995) Integral cytochrome*c*-oxidase – preparation and progress towards a 3-dimensional crystallization, *Eur. J. Biochem.*, **227**, 588-595.
- Liao, G. L., and Palmer, G. (1996) The reduced minus oxi-36. dized difference spectra of cytochromes a and a(3),
- *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1274**, 109-111. Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1988) H₂O₂-37. induced conversion of cytochrome c oxidase peroxy complex to oxoferryl state, *Ann. NY Acad. Sci.*, **550**, 124-138. Fabian, M., and Palmer, G. (1995) The interaction of
- 38. cytochrome oxidase with hydrogen peroxide: the relation-ship of compounds P and F, *Biochemistry*, **34**, 13802-13810.
- Bergmayer, H. U., Gawehn, K., and Grassl, M. (1970) 39 Methoden der Enzymatischen Analyze (Bergmayer, H. U., ed.), 1, 440.
- Kopcova, K., Mikulova, L., Pechova, I., Sztachova, T., Cizmar, E., et al. (2020) Modulation of the electron-pro-40.

ton coupling at cytochrome a by the ligation of the oxidized catalytic center in bovine cytochrome c oxidase, Biochim. Biophys. Acta Bioenerg., 1861, 148237.

- Morin, P. E., and Freire, E. (1991) Direct calorimetric analysis of the enzymatic activity of yeast cytochrome c41 oxidase, Biochemistry, 30, 8494-8500.
- 42. Junemann, S., Heathcote, P., and Rich, P. R. (2000) The reactions of hydrogen peroxide with bovine cytochrome coxidase, Biochim. Biophys. Acta, 1456, 56-66.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) 43. Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome c oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo
- state, *Biochemistry*, **38**, 4853-4861. Yu, M. A., Egawa, T., Shinzawa-Itoh, K., Yoshikawa, S., Guallar, V., et al. (2012) Two tyrosyl radicals stabilize high 44. oxidation states in cytochrome c oxidase for efficient energy conservation and proton translocation, J. Am. Chem. Soc., 134, 4753-4761
- 45. Shimada, A., Etoh, Y., Kitoh-Fujisawa, R., Sasaki, A., Shinzawa-Itoh, K., et al. (2020) X-ray structures of cat-alytic intermediates of cytochrome c oxidase provide insights into its O₂ activation and unidirectional protonpump mechanisms, J. Biol. Chem., 295, 5818-5833
- Kaila, V. R., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (2010) 46. Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase, Chem. Rev., 110, 7062-7081.
- Jancura, D., Stanicova, J., Palmer, G., and Fabin, M. 47 (2014) How hydrogen peroxide is metabolized by oxidized cytochrome c oxidase, Biochemistry, 53, 3564-3575
- 48. Chen, Y. R., Gunther, M. R., and Mason, R. P. (1999) An electron spin resonance spin-trapping investigation of the free radicals formed by the reaction of mitochondrial cytochrome c oxidase with H_2O_2 , J. Biol. Chem., 274, 3308-3314.
- Weng, L. C., and Baker, G. M. (1991) Reaction of hydro-49. gen peroxide with the rapid form of resting cytochrome oxidase, *Biochemistry*, **30**, 5727-5733. Brittain, T., Little, R. H., Greenwood, C., and Watmough,
- 50. N. J. (1996) The reaction of *Escherichia coli* cytochrome *bo* with H2O2: evidence for the formation of an oxyferryl species by two distinct routes, FEBS Lett., 399, 21-25.
- Konstantinov, A. A., Capitanio, N., Vygodina, T. V., and Papa, S. (1992) pH changes associated with cytochrome *c* 51. oxidase reaction with H_2O_2 . Protonation state of the peroxy and oxoferryl intermediates, *FEBS Lett.*, **312**, 71-74.
- Ksenzenko, M., Vygodina, T. V., Berka, V., Ruuge, E. K., and Konstantinov, A. A. (1992) Cytochrome oxidase-cat-52. alyzed superoxide generation from hydrogen peroxide,
- FEBS Lett., 297, 63-66. Luo, Y.-R. (2007) Comprehensive Handbook of Chemical 53. Bond Energies, CRC Press, Boca Raton.
- Blomberg, M. R. A., Siegbahn, P. E. M., Babcock, G. T., 54. and Wikstrom, M. (2000) Modeling cytochrome oxidase: a quantum chemical study of the O-O bond ceavage mechanism, J. Am. Chem. Soc., 122, 12848-12858
- Blomberg, M. R., Siegbahn, P. E., and Wikstrom, M. (2003) Metal-bridging mechanism for O–O bond cleavage 55. in cytochrome *c* oxidase, *Inorg. Chem.*, **42**, 5231-5243. Blomberg, M. R. A. (2019) Active site midpoint potentials
- 56. in different cytochrome c cxidase families: a computation-
- al comparison, *Biochemistry*, **58**, 2028-2038. Khan, K. K., Mondal, M. S., Padhy, L., and Mitra, S. (1998) The role of distal histidine in peroxidase activity of 57. myoglobin-transient-kinetics study of the reaction of H_2O_2 with wild-type and distal-histidine-mutanted recombinant human myoglobin, *Eur. J. Biochem.*, **257**, 547-555. Mondal, M. S., and Mitra, S. (1996) Kinetic studies of the
- 58. two-step reactions of H_2O_2 with manganese-reconstituted myoglobin, *Biochim. Biophys. Acta*, **1296**, 174-180.
- 59. Baek, H. K., and Van Wart, H. E. (1989) Elementary steps in the formation of horseradish peroxidase compound I: direct observation of compound 0, a new intermediate with a hyperporphyrin spectrum, *Biochemistry*, **28**, 5714-5719. 60. Khan, K. K., Mondal, M. S., and Mitra, S. (1996) Kinetic

studies of the reaction of hydrogen peroxide with manganesereconstituted horseradish peroxidase, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.*, 1059-1062. Rigby, S. E., Junemann, S., Rich, P. R., and Heathcote, P.

- 61. Rigby, S. E., Junemann, S., Rich, P. R., and Heathcote, P. (2000) Reaction of bovine cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide produces a tryptophan cation radical and a porphyrin cation radical, *Biochemistry*, **39**, 5921-5928.
- because produces a dyperplian earlier nation nation and a porphyrin cation radical, *Biochemistry*, **39**, 5921-5928.
 Budiman, K., Kannt, A., Lyubenova, S., Richter, O. M., Ludwig, B., et al. (2004) Tyrosine 167: the origin of the radical species observed in the reaction of cytochrome c oxidase with hydrogen peroxide in *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **43**, 11709-11716.
- Biochemistry, 43, 11709-11716.
 63. MacMillan, F., Kannt, A., Behr, J., Prisner, T., and Michel, H. (1999) Direct evidence for a tyrosine radical in the reaction of cytochrome *c* oxidase with hydrogen peroxide, *Biochemistry*, 38, 9179-9184.
- 64. Rich, P. R., Rigby, S. E., and Heathcote, P. (2002) Radicals associated with the catalytic intermediates of bovine cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1554**, 137-146.
- Musatov, A., Hebert, E., Carroll, C. A., Weintraub, S. T., and Robinson, N. C. (2004) Specific modification of two tryptophans within the nuclear-encoded subunits of bovine cytochrome c oxidase by hydrogen peroxide, *Biochemistry*, 43, 1003-1009.
- Musatov, A., and Robinson, N. C. (2012) Susceptibility of mitochondrial electron-transport complexes to oxidative damage. Focus on cytochrome *c* oxidase, *Free Radic. Res.*, 46, 1313-1326.
- Lemma-Gray, P., Weintraub, S. T., Carroll, C. A., Musatov, A., and Robinson, N. C. (2007) Tryptophan 334 oxidation in bovine cytochrome *c* oxidase subunit I involves free radical migration, *FEBS Lett.*, **581**, 437-442.
 Fabian, M., and Palmer, G. (1999) Redox state of peroxy
- Fabian, M., and Palmer, G. (1999) Redox state of peroxy and ferryl intermediates in cytochrome c oxidase catalysis, *Biochemistry*, 38, 6270-6275.
- Biochemistry, 38, 6270-6275.
 King, N. K., and Winfield, M. E. (1963) The mechanism of metmyoglobin oxidation, *J. Biol. Chem.*, 238, 1520-1528.
- 70. Wilks, A., and Ortiz de Montellano, P. R. (1992) Intramolecular translocation of the protein radical formed in the reaction of recombinant sperm whale myoglobin with H_2O_2 , J. Biol. Chem., 267, 8827-8833.
- Tew, D., and Ortiz de Montellano, P. R. (1988) The myoglobin protein radical. Coupling of Tyr-103 to Tyr-151 in the H₂O₂-mediated cross-linking of sperm whale myoglobin, *J. Biol. Chem.*, 263, 17880-17886.

- Witting, P. K., Douglas, D. J., and Mauk, A. G. (2000) Reaction of human myoglobin and H₂O₂. Involvement of a thiyl radical produced at cysteine 110, *J. Biol. Chem.*, 275, 20391-20398.
- Reeder, B. J., Svistunenko, D. A., Cooper, C. E., and Wilson, M. T. (2004) The radical and redox chemistry of myoglobin and hemoglobin: from in vitro studies to human pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, 6, 954-966.
- pathology, *Antioxid. Redox Signal.*, 6, 954-966.
 74. Svistunenko, D. A., Dunne, J., Fryer, M., Nicholls, P., Reeder, B. J., et al. (2002) Comparative study of tyrosine radicals in hemoglobin and myoglobins treated with hydrogen peroxide, *Biophys. J.*, 83, 2845-2855.
 75. Svistunenko, D. A. (2001) An EPR study of the peroxyl
- Svistunenko, D. A. (2001) An EPR study of the peroxyl radicals induced by hydrogen peroxide in the haem proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1546**, 365-378.
 Erman, J. E., and Yonetani, T. (1975) A kinetic study of the study of
- Erman, J. E., and Yonetani, T. (1975) A kinetic study of the endogenous reduction of the oxidized sites in the primary cytochrome *c* peroxidase-hydrogen peroxide compound, *Biochim. Biophys. Acta*, **393**, 350-357.
- Biochim. Biophys. Acta, 393, 350-357.
 77. Hiner, A. N., Martinez, J. I., Arnao, M. B., Acosta, M., Turner, D. D., et al. (2001) Detection of a tryptophan radical in the reaction of ascorbate peroxidase with hydrogen peroxide, *Eur. J. Biochem.*, 268, 3091-3098.
- 78. Miller, V. P., Goodin, D. B., Friedman, A. E., Hartmann, C., and Ortiz de Montellano, P. R. (1995) Horseradish peroxidase Phe172→Tyr mutant. Sequential formation of compound I with a porphyrin radical cation and a protein radical, J. Biol. Chem., 270, 18413-18419.
- Wu, G., Rogge, C. E., Wang, J. S., Kulmacz, R. J., Palmer, G., and Tsai, A. L. (2007) Oxyferryl heme and not tyrosyl radical is the likely culprit in prostaglandin H synthase-1 peroxidase inactivation, *Biochemistry*, 46, 534-542.
 Blomberg, M. R. A., and Siegbahn, P. E. M. (2014) Proton
- 80. Blomberg, M. R. A., and Siegbahn, P. E. M. (2014) Proton pumping in cytochrome c oxidase: energetic requirements and the role of two proton channels, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1165-1177.
- Sharpe, M. A., and Ferguson-Miller, S. (2008) A chemically explicit model for the mechanism of proton pumping in heme-copper oxidases, *J. Bioenerg. Biomembr.*, 40, 541-549.
 Brzezinski, P., and Gennis, R. B. (2008) Cytochrome c
- Brzezinski, P., and Gennis, R. B. (2008) Cytochrome c oxidase: exciting progress and remaining mysteries, J. Bioenerg. Biomembr., 40, 521-531.
- Rich, P. Ř. (2017) Mitochondrial cytochrome *c* oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, 45, 813-829.

THERMODYNAMICS OF THE P-TYPE FERRYL FORM OF BOVIN CYTOCHROME *c* OXIDASE

L. Mikulova¹, I. Pechova², D. Jancura², M. Stupak³, and M. Fabian^{1*}

¹ Center for Interdisciplinary Biosciences, Technology and Innovation Park, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic; E-mail: marian.fabian@upjs.sk

² Department of Biophysics, Faculty of Science, University of P. J. Šafárik, 04154 Košice, Slovak Republic

³ Department of Medical and Clinical Biochemistry, Faculty of Medicine, 04011 Košice, Slovak Republic

Several ferryl states of the catalytic heme a_3 -Cu_B center of the respiratory cytochrome *c* oxidases (CcOs) are observed during the reduction of O₂ to H₂O. One of the **P**-type ferryl forms, **P**_M, is produced by the reaction of the two-electron reduced CcO with O₂. In this state, the heme a_3 iron is in the ferryl state and a free radical should be also present at the catalytic center. However, the energetics of the **P**_M formation has not been experimentally established yet. Here, the generation of **P**_M by the reaction of oxidized bovine CcO (**O**) with one molecule of H₂O₂ was investigated by the isothermal titration calorimetry and UV-Vis absorption spectroscopy. Two kinetic phases, corresponding to the formation of **P**_M and its endogenous conversion back to **O**, were resolved by both methods. The Δ H of the entire process (-66 kcal/mol H₂O₂) was larger than the heat (-50.8 kcal/mol O₂) liberated during O₂ reduction by ferrocytochrome *c* (pH 8, 25°C). Interestingly, Δ H of the first phase (-32 kcal/mol ferryl state) far exceeds the enthalpy of the **P**_M production. The data indicate that during the first phase, the radical in **P**_M is quenched and spectrally similar second **P**-type ferryl form (**P**_R) is produced. Additionally, it was shown that the entropy contribution to the Gibbs energy change (Δ G = -46 kcal/mol O₂) during the catalytic reduction of O₂ by ferrocytochrome *c* is negligible (-0.7 cal·mol^{-1.}K⁻¹).

Keywords: cytochrome *c* oxidase, hydrogen peroxide, ferryl state, isothermal titration calorimetry

УДК 577.152.193

ЗАГАДКА 2-Cys-ПЕРОКСИРЕДОКСИНОВ: КАКОВА ИХ РОЛЬ В КЛЕТКЕ?

Обзор

© 2021 А.В. Пескин*, К.С. Уинтерборн

Centre for Free Radical Research, University of Otago Christchurch, 8140 Christchurch, New Zealand; E-mail: alexander.peskin@otago.ac.nz

> Поступила в редакцию 02.09.2020 После доработки 09.10.2020 Принята к публикации 09.10.2020

2-Суѕ пероксиредоксины являются широко распространенными белками, содержащими активную тиольную группу, которые эффективно вступают в реакции с различными пероксидами. В отличие от других ферментов, их исключительно высокая реакционная способность не зависит от кофакторов. Механизм окисления и восстановления пероксиредоксинов представляет этим белкам хорошую возможность действовать как антиоксиданты, а кроме того, участвовать в редокс-путях передачи сигнала. Понимание тонкостей функционирования пероксиредоксинов необходимо для трансляционной медицины.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: пероксиредоксин, тиолы, редокс, сигнальные пути, пероксид. **DOI:** 10.31857/S0320972521010085

«Защищать и служить» Девиз LAPD

ИСТОРИЧЕСКИЙ АСПЕКТ

Пероксиредоксины являются широко распространенными тиол-содержащими белками. Их открытие не было одномоментным событием и было растянуто во времени. Отправной точкой в этом открытии стало обнаружение неизвестного фактора, который защищал глутаминсинтетазу дрожжей от окисления тиол-зависимым образом [1]. Белок, который был ответственен за эту защиту, был очищен и охарактеризован как тиол-специфичный антиоксидант (TSA – thiol-specific antioxidant). Первоначальная гипотеза заключалась в том, что этот защитный эффект мог быть результатом реакции белка с реакционноспособными формами серы. Было показано, что дрожжевые клетки, которые культивировались в условиях окислительного стресса, экспрессируют повышенное количество TSA. В то же время мутантные дрожжевые клетки, которые не продуцировали TSA, с трудом росли в аэробных условиях [2, 3]. Позже подобный белок был очищен из ткани мозга крыс [4]. Дальнейший прогресс был достигнут при исследовании бактерий, у которых их алкилгидропероксид-редуктазная активность приводила к восстановлению перекиси водорода за счет NADPH [5]. Оказалось, что очищенная ферментативная активность была связана с двумя белками – AphC и AphF. Секвенирование кодирующих эти белки генов показало, что белок AphF является гомологом тиоредоксинредуктазы, и после периода некоторого замешательства стало ясным, что в белке AphC имеются высоко консервативные последовательности, характерные также для TSA [6, 7].

В последующих работах было показано, что эти ферменты являются представителями большого семейства белков, присутствующих в клетках всех биологических видов. В 1994 г. они были названы пероксиредоксинами, и это оказалось удивительным предвидением. К тому времени уже было известно 46 белков из различных биологических видов, для которых была уста-

Принятые сокращения: C_pSH — пероксидативный остаток цистеина; C_pSOH — сульфеновая кислота; C_pSO_2H — сульфиновая кислота; C_RSH — результирующий остаток цистеина; Grx — глутаредоксин; GSH — глутатион; Prdx — пероксиредоксин; Srx — сульфиредоксин; Trx — тиоредоксин; Trx — тиоредоксин; TSA — тиол-специфичный антиоксидант.

^{*} Адресат для корреспонденции.

новлена гомология с TSA и AphC, но при этом их участие в биохимических путях оставалось невыясненным [7]. Для сокращенного обозначения пероксиредоксинов исходно использовались термины Prx и Prdx, но недавно они были рационализированы до единого обозначения — Prdx.

Число структурно охарактеризованных пероксиредоксинов (Prdx) постоянно растет. Основываясь на аминокислотных последовательностях, находящихся вблизи активного центра, пероксиредоксины можно разделить на шесть групп [8]. Все Prdх имеют высокореактивный остаток цистеина (пероксидативный, C_PSH), который при реакции с пероксидом образует сульфеновую кислоту (C_PSOH). В соответствии с каталитическим механизмом для восстановления C_PSOH , эти белки можно разделить на три подсемейства [9].

1. Типичный 2-Суз Prdx. Сульфеновая кислота реагирует с результирующим остатком цистеина (C_RSH) другой субъединицы конститутивного нековалентного гомодимера.

2. Нетипичный 2-Cys Prdx. Образование дисульфида происходит с участием C_RSH , находящегося на одной и той же субъединице.

3. 1-Суѕ Prdx. C_RSH отсутствует, и другие тиолы участвуют в реакции с C_PSOH .

Отличительной особенностью 2-Суѕ пероксиредоксинов является их способность образовывать высокомолекулярные комплексы, состоящие, в зависимости от конкретного белка, из 5 или 6 димеров. Поскольку молекулярная масса мономеров составляет примерно 22 кДа, декамер Prdx2 (рис. 1) человека имеет молекулярную массу 220 кДа.

Эти регулярные структуры имеют пончикообразную форму, и они могут быть визуализированы с помощью метода трансмиссионной электронной микроскопии (TEM – transmission electron microscopy). С помощью метода TEM пероксиредоксин эритроцитов выявлялся в виде единого торического белка, состоящего из 10 субъединиц и названного торином еще до того, как были обнаружены TSA и установлена каталитическая активность пероксиредоксинов [10].

В настоящем обзоре будут подробно рассмотрены 2-Суѕ пероксиредоксины (Prdxs).

2-Суѕ ПЕРОКСИРЕДОКСИНЫ

Каталитический цикл 2-Суѕ пероксиредоксинов. 2-Суѕ Prdxs существуют как обязательные нековалентные гомодимеры, соединённые между собой в положении «голова-хвост»; эти димеры являются минимальными каталитически-



Рис. 1. Декамер Prdx2. Стрелками обозначены положения активных центров пероксидативного (C_P) и результирующего (C_R) остатков цистеина в димерной единице, сплошные стрелки для одной пары C_P и C_R , а пунктирные – для другой. Расстояние между C_P и C_R составляет 14 Å. Адаптировано из статьи, doi: 10.2210/pdb1QMV/pdb, http://www.rcsb.org/structure/1QMV. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

ми единицами. Активный центр фермента с С_РSH высоко консервативен для всех представителей семейства пероксиредоксинов. Непосредственным продуктом реакции с пероксидом является сульфеновая кислота, C_PSOH. Структура активного центра этих ферментов организована уникальным образом для осуществления нуклеофильной атаки на связь пероксил-О-О- [11-13]. Пероксиредоксины расщепляют эту связь в перекиси водорода [4, 7, 14], алкил-пероксидах (7, 15, 16), пероксинитрите [17-21] и гидропероксидах аминокислот и белков [22]. В клетках млекопитающих выявлены четыре изоформы 2-Суѕ пероксиредоксинов – цитозольные белки Prdx1 и Prdx2, митохондриальный белок Prdx3 и Prdx4, локализованный в эндоплазматическом ретикулуме. В типичных 2-Cys Prdx консервативный остаток цистеина С_R на С-конце не может конкурировать с C_PSH за пероксид, но способен эффективно восстанавливать C_PSOH на другой субъединице с образованием дисульфида. Кроме участия в реакции образования дисульфидной связи, C_PSOH также может вступить в реакцию с другой молекулой пероксида и подвергаться гиперокислению с образованием сульфиновой кислоты, C_PSO₂H (рис. 2).



Рис. 2. Схема поэтапного окисления нековалентного димера 2-Cys Prdx

Дисульфид может быть эффективно восстановлен тиоредоксином (Trx) и тиоредоксинредуктазой (TrxR) [7] или системой глутатиона (GSH) и глутаредоксина (Grx) [23]. Ранее образование C_PSO₂H считалось необратимым процессом, однако открытие сульфиредоксина (Srx) выявило сложный механизм полного, хотя и медленного, восстановления функционально активного белка [24]. Эффективность гиперокисления различных 2-Суѕ пероксиредоксинов регулируется С-концевой аминокислотной последовательностью, в которой содержится C_RSH [25]. Так, бактериальный пероксиредоксин АhpС чрезвычайно устойчив к гиперокислению. Эукариотический цитозольный Prdx2 очень чувствителен, а устойчивость к гиперокислению митохондриального белка Prdx3 находится посередине [26].

Реакционная способность пероксиредоксина. Первый представитель пероксиредоксинов был обнаружен как белок, который защищает другой белок от окислительного повреждения [1]. Дальнейшие исследования кристаллической структуры, энзимологические и генетические данные дали ясно понять, что Prdxs являются антиоксидантными белками, действие которых направлено на пероксиды [4, 7, 11, 12, 14]. Однако было трудно понять, как Prdxs могут проявлять защитное действие, так как их каталитическая эффективность, измеренная в то время, была на два порядка ниже, чем у каталазы или глутатионпероксидаз, содержащих селеноцистеин [15]. Действительно, в то время была выдвинута точка зрения, что «идея о том, что они могут быть чемто иным, чем антиоксидантами, поддерживающими глутатионпероксидазу или каталазу, вероятно, может быть проигнорирована. Ситуация, когда любой из пероксиредоксинов может конкурировать с каталазой за общий субстрат, H₂O₂, по-видимому, не существует» [15].

К середине нулевых годов расчет константы скорости второго порядка для реакции Prdx с H_2O_2 производился с использованием системы, в которой восстановление H_2O_2 пероксиредоксином было сопряжено с Trx, TrxR и NADPH. Следовательно, измерение проходило по цепочке следующих реакций: 1) окисление Prdx перекисью водорода, 2) восстановление Prdx тиоредоксином, 3) восстановление тиоредоксина тиоредоксинредуктазой и 4) окисление NADPH тиоредоксинредуктазой. Поэтому измеряемая активность отражала, скорее, скорость наиболее медленной реакции в этой системе, а не собственно скорость реакции Prdx с H_2O_2 .

Измерение скорости прямой реакции оказалось непростой задачей. Очищенный Prdx после восстановления и удаления восстановителя быстро возвращался в окисленное состояние.

Оказалось, что виновником был случайный пероксид, присутствующий в буферных растворах. Когда эта проблема была обозначена, и были применены соответствующие технологии, позволяющие работать с очищенными препаратами пероксиредоксина в отсутствие восстановителей, константа скорости прямой реакции второго порядка Prdx с H_2O_2 оказалась намного выше. В конкурентных опытах с пероксидазой хрена или каталазой её величина оказалась равной $2-4 \times 10^7$ M⁻¹·c⁻¹ [19, 27, 28]. Измерения, основанные на потере внутренней флуоресценции Prdx в результате окисления H₂O₂, дали значение ~ 10^8 М⁻¹·с⁻¹ [29]. Такой уровень эффективности фермента позволяет внести пероксиредоксины не только в список первоосновных антиоксидантов, а также в ряд самых быстродействующих ферментов, но и выделить их в отдельный класс. В отличие от других ферментов исключительно высокая реакционная способность Prdx не зависит от кофакторов.

Пероксидативный остаток цистеина в активном центре Prdx необходим для реакции с пероксидом. Способность остатков цистеина вступать в реакцию зависит от степени их ионизации [30], и значение р K_a для C_PSH оказалось равным 6 [27, 31], что поддерживает его в ионизированном состоянии при физиологических значениях рН. Однако реакционная способность пероксиредоксинов на много порядков превышала значения, определенные для других тиол-зависимых ферментов [32]. Исключительная реакционная способность C_PSH обусловлена высокоорганизованной сетью водородных связей в активном центре фермента и нахождением в непосредственной близости консервативных остатков пролина, аргинина и треонина [11–13, 33, 34]. Их координированное действие стабилизирует переходное состояние со связанным субстратом, ослабляет связь -О-О- и приближает проксимальный атом кислорода к $C_{P}SH$. По-видимому, даже более отдаленные от С_рSH аминокислоты участвуют в поддержании его высокой реактивности, поскольку их мутации резко снижают скорость реакции [35-37].

Положение C_PSH в активном центре фермента позволяет проведение агрессивной нуклеофильной атаки на широкий спектр субстратов типа ROOH. В то же время высокая реакционная способность Prdx в отношении пероксидов не проявляется в отношении других электрофилов. Типичные тиоловые реагенты, такие как иодоацетамид и хлорамины, взаимодействуют с C_PSH намного медленнее, чем с другими тиолами с низкими значениями р K_a [27, 38].

Структурные исследования показали, что С_PSH располагается в основании кармана ак-

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

тивного центра в полностью свернутом состоянии (FF – fully folded state). После образования C_PSOH в результате окисления он может вступать в реакцию с другой молекулой H_2O_2 , и образующийся C_PO_2H остается в состоянии FF. В противном случае C_PSOH смещается из кармана активного центра в направлении C_RSH и приобретает локально развернутую структуру (LU) в ходе образования дисульфидной связи [39].

Пероксидативные тиолы димеров 2-Суѕ Prdxs демонстрируют положительное кооперативное действие. В том случае, когда первый C_PSH находится в виде сульфеновой кислоты, второй C_PSH быстрее, чем первый, вступает в реакцию с H_2O_2 . Кооперативность отсутствует, если уже был образован дисульфид C_PS-SC_R [40].

Влияние С-конца на окисление Prdx. Начальная реакция всех 2-Суз пероксиредоксинов с H_2O_2 происходит одинаково быстро, в то время как восприимчивость к гипероксидации сильно варьируется. Возможность для остатка C_PSOH быстро вступать в реакцию с другой молекулой H_2O_2 исчезает, как только он выходит из кармана активного центра и приобретает конформационное состояние LU. Структура *С*-концевого хвостового участка, на котором располагается $C_{R}SH$, оказывает влияние на чувствительность к гиперокислению. 2-Суѕ пероксиредоксины млекопитающих, которые в отличие от бактериальных ферментов намного более чувствительны к гиперокислению, имеют дополнительную Сконцевую петлю, содержащую мотив GGLG и спираль, содержащую мотив YF. Эти последовательности присутствуют только у пероксидчувствительных Prdx, и они замедляют способность $C_{R}SH$ реагировать с $C_{P}SOH$. В результате появляется повышенная возможность для С_РSOH вступать в реакцию с другой молекулой H₂O₂ [39].

Кроме того, 2-Суѕ пероксиредоксины млекопитающих отличаются друг от друга по их чувствительности к гиперокислению. Так, цитоплазматический белок Prdx2 в 10 раз более подвержен гиперокислению, чем митохондриальный белок Prdx3 [26], а Prdx1 располагается между ними [41]. Мутации с заменой аминокислотных остатков в *C*-концевом хвостовом участке могут делать Prdx2 менее чувствительным, а Prdx3 более чувствительным к гиперокислению [42].

Восстановление 2-Cys Prdx. Показано, что тиоредоксин эффективно восстанавливает дисульфидные связи в 2-Cys пероксиредоксинах (рис. 2). Для поддержания пероксиредоксинов в восстановленной форме их рециклизует Trx с помощью тиоредоксинредуктазы с использованием NADPH в качестве источника восстановительных эквивалентов [7]. Следовательно, каталитическое восстановление ROOH Prdx в клетке зависит от поддержки других тиол-содержащих соединений и общего состояния метаболизма, которое обеспечивает клетку достаточным количеством восстанавливающих эквивалентов. Так, синдром дефицита глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы ограничивает продукцию NADPH по пентозофосфатному пути и препятствует эффективному восстановлению уровня Prdx2 в эритроцитах в условиях окислительного стресса [43].

Кроме системы Trx, рециклизация также может быть осуществлена системой GSH и Grx [23], как это показано на рис. 3. Эти две системы могут дополнять друг друга, например в эритроцитах. В условиях пониженной активности TrxR [44] GSH и Grx могут взять на себя бремя рециклизации белков Prdx.

Также был обнаружен эффект кооперативности в процессе восстановления двух дисульфидов в полностью окисленных димерах Prdx. Оказалось, что дитиотрейтол-зависимое восстановление второго дисульфида протекает примерно в 2 раза быстрее [40].

Гиперокисление 2-Суз Prdx. Гиперокисление, которое исходно рассматривалось как инактивация пероксиредоксинов, может быть повернуто вспять сульфиредоксином [45]. Эта реакция проходит медленно и состоит из нескольких этапов. Сначала Srx катализирует фосфорилирование C_pSO_2H за счет ATP. Затем под воздействием Srx эфир сульфиновой кислоты и фосфорила подвергается гидролизу с образованием тиосульфината с Prdx. На следующем этапе при участии GSH образуются глутатионилированные Srx и C_pSOH . Для полного восстановления далее необходимо вернуть сульфенилированный Prdx в его восстановленное состояние, а также привлечь дополнительную молекулу GSH для рециклизации Srx [24, 46]. Очевидно, что энергетические затраты на восстановление гиперокисленных Prdx высоки, что говорит о важности этого процесса.

Исследования структуры гиперокисленного Prdx2 показали, что C_pSO_2H погружен в активный центр. Поэтому было неясно, как чисто механически Srx может получить к нему доступ. Анализ кристаллической структуры комплекса Prdx—Srx показал, что белки тесно переплетены с полностью развернутой структурой *C*-концевого участка Prdx, располагающегося на обратной стороне Srx вдали от активного центра Srx [47]. Такое изощрённое взаимодействие белков предполагает, что Srx эволюционировал у эукариот строго специфично для восстановления сульфиновой кислоты в Prdx.

Для того чтобы произошло гиперокисление, C_PSOH должен вступить в реакцию со второй молекулой H_2O_2 вместо того, чтобы вместе с C_RSH образовать дисульфид (рис. 1). Это можно наблюдать в экспериментах *in vitro* при непре-



Рис. 3. Схематическое изображение восстановления дисульфидной связи в подвергшемся окислению димере Prdx. Для упрощения показан один активный центр. Восстановление может происходить под действием тиоредоксина (Trx) или глутатиона (GSH) с участием глутаредоксина (Grx)

рывном определении пероксидазной активности, когда Prdx смешивается с H_2O_2 в присутствии Trx, TrxR и NADPH и регистрируется скорость окисления NADPH. При каждом обороте цикла происходит окисление части C_PSOH. Поэтому со временем процесс окисления NADPH замедляется из-за накопившихся гиперокисленных Prdx [20, 48]. С другой стороны, в экспериментах с очищенными восстановленными Prdx было показано, что оборот не является необходимым для гиперокисления, и при значительной концентрации H₂O₂ процесс гиперокисления в единичном цикле может одержать верх над образованием C_PS-SC_R [26]. В гиперокислении пероксиредоксинов в клетках могут быть задействованы оба механизма. Однако остаются некоторые моменты, которые необходимо прояснить, - почему в присутствии Trx, TrxR и NADPH степень гиперокисления Prdx меньше, чем предсказываемая на основе констант скорости реакции второго порядка, полученных в экспериментах с очищенными белками.

Функции пероксиредоксинов. В клетках Prdx не ограничены одной физиологической ролью. Скорее они являются центральными фигурами в редокс-метаболизме и могут выполнять различные функции.

Высокая реакционная способность, а также высокой уровень экспрессии белка в клетках позволяет считать, что в первую очередь с перекисями реагируют Prdxs [32]. В этой связи их можно рассматривать как антиоксидантные ферменты наряду с супероксиддисмутазами (SOD), глутатионпероксидазами (Gpxs) и каталазами.

Помимо их эффективности, широкий круг их субстратов, включая пероксинитрит, делает Prdxs незаменимыми антиоксидантами. Так, гидроперекиси свободных аминокислот и белков представляют серьезную угрозу для клеток, и Prdxs являются единственными известными белками, способными удалять их [22]. Еще одна важная особенность заключается в том, как Prdxs удаляют H_2O_2 . В отличие от каталаз, они не выделяют кислород в качестве продукта реакции и, следовательно, полностью подавляют образование активных форм кислорода.

Результаты расчетов реакционной способности и количества Prdx показывают, что другие тиол-содержащие мишени, медленно реагирующие с H_2O_2 , внутри клеток не должны подвергаться окислению. Однако в действительности обработка клеток H_2O_2 приводит к окислению этих тиоловых белков, чего, исходя из их низкой реакционной способности, теоретически, не должно было произойти [32]. Для описания роли Prdx в регуляции редокс-гомеостаза был предло-

жен механизм «шлюза», основанный на чувствительности Prdx млекопитающих к гиперокислению. В своей первоначальной форме теория предполагала, что Prdx потребляет H_2O_2 до тех пор, пока окислитель не накапливается до достаточно высокого уровня, чтобы подвергнуть Prdx гиперокислению, и в этот момент другие менее реактивные мишени способны подвергаться окислению [39]. Теория «шлюза» также может быть интерпретирована как механизм, который освобождает Trx от восстановления Prdx, что приводит к увеличению активности Trx, доступной для восстановления других мишеней [49].

Другим объяснением окисления тиоловых белков, медленно реагирующих с H₂O₂, может быть то, что пероксиредоксины действуют как сенсоры Н₂О₂ и направляют окислительные эквиваленты к соответствующим белкам, таким как фосфатазы и факторы транскрипции при помощи механизма эстафеты (relay) [50]. Роль пероксиредоксинов в Н₂O₂-опосредованной передаче сигнала нашла строгое экспериментальное подтверждение. Кроме того, были обнаружены смешанные дисульфидные связи пероксиредоксинов и белков-мишеней в клетках, обработанных H₂O₂ [51–53]. В отдельных случаях доказать, что такие эстафеты существуют довольно непросто. Например, при обработке клеток низкими дозами H_2O_2 (i) видно синхронное окисление Prdx2 и CRMP2 (collapsin response mediator protein 2), (ii) иммунопреципитация Prdx2 происходит совместно с CRMP2, (iii) в клетках можно наблюдать ко-локализацию этих двух белков. Однако смешанного дисульфида обнаружено не было. В клеточной среде такие смешанные дисульфиды могут быть слишком короткоживущими из-за быстрого восстановления, кроме того, их можно не увидеть in vitro, ecли для объединения партнеров необходим другой (скаффолд) белок [54].

Чисто механически эта эстафета может происходить через (i) обмен тиольными группами между дисульфидной связью в Prdx и восстановленным белком-мишенью или (ii) образование смешанной дисульфидной связи в том случае, если белок-мишень реагирует с С_РSOH, вытесняя C_RSH. Аргументы против механизма обмена могут быть следующие: (i) относительно низкая скорость обмена тиольных групп и (ii) конкуренция с GSH, Trx и другими белками, содержащими тиольную группу. Однако механизмы обмена нельзя сбрасывать со счетов, поскольку, теоретически, они могут быть облегчены с помощью скафолда. С другой стороны, особенности энзимологии 2-Cys Prdx делают возможной реакцию белка-мишени с С_РSOH. Скорость димеризации пероксиредоксинов относительно мала (2 c^{-1} – в случае Prdx2), в то время как образование C_PSOH протекает в течение микросекунд [21, 26]. Относительно небольшая скорость конденсации с C_RSH обеспечивает возможность для C_PSOH вступать в реакцию с другой мишенью. Это может быть дополнительно усилено тем, что имеется эффект отрицательной кооперативности, который вдвое снижает скорость конденсации второго активного центра, когда один дисульфид уже образован [40].

Функция шаперона, защищающая другие белки от инактивации, была признана в качестве физиологической роли пероксиредоксинов еще до того момента, когда стала известна их высокая реакционная способность в отношении ROOH [55]. Нековалентные димеры Prdx организованы в регулярные пончикообразные структуры. Эти декамеры (или додекамеры) могут защищать другие белки от инактивации и агрегации. Образование дисульфидов в димерах Prdx снижает стабильность этих тороидов, в то время как гиперокисление делает их более стабильными. Таким образом, Prdxs в их восстановленном и гиперокисленном состояниях могут осуществлять функцию шаперонов [56]. Шапероновая активность Prdx может не только защищать белки от инактивации и агрегации, но и способствовать восстановлению неправильно свернутых белков. Гиперокисленный Prdx вместе с Hsp70 образует комплексы с неправильно свернутыми белками с последующим рекрутированием Hsp104. Затем Srx присоединяется к комплексу, и после восстановления C_PSO₂H происходит разрушение комплекса с высвобождением восстановленного нативного белка [57].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

2-Суѕ пероксиредоксины способны защищать клетки эффективно инактивируя ROOH и

- Kim, K. H., Lee, K. Y., Kim, I. H., Rhee, S. G., and 1. Stadtman, E. R. (1988) The Isolation and purification of a specific protector protein which inhibits enzyme inactivation by a thiol/Fe(III)/O₂ mixed-function oxidation system, J. Biol. Chem., 263, 4704-4711.
- 2. Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1989) Induction of an antioxidant protein of Saccharomyces cerevisiae by O₂, Fe³⁺, or 2-mercaptoethanol, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 86, 6018-6022
- Chae, H. Z., Kim, I. H., Kim, K., and Rhee, S. G. (1993) 3 Cloning, sequencing, and mutation of thiol-specific antioxidant gene of Saccharomyces cerevisiae, J. Biol. Chem., 268, 16815-16821.
- 4. Chae, H. Z., Robison, K., Poole, L. B., Church, G., Storz, G., and Rhee, S. G. (1994) Cloning and sequencing of thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl

сохраняя целостность структуры белков. Они также могут обнаруживать пероксиды и передавать окислительно-восстановительные сигналы другим белкам. Неудивительно, что такие универсальные белки вовлечены в различные патологии [58, 59]. Например, в раковых клетках наблюдается повышение экспрессии пероксиредоксинов [60]. Естественно, идёт поиск специфичного ингибитора Prdx. Однако это непростая задача: найти ингибитор, который может целенаправленно воздействовать на тиольные группы в белке Prdx и при этом не действовать на тиольные группы в других белках. Так, биологический эффект аденантина (дитерпеноида, выделенного из листьев, который индуцирует дифференцировку клеток острой промиелоцитической лейкемии) исходно был ассоциирован с его целенаправленным воздействием на 2-Суѕ пероксиредоксины [61]. Однако оказалось, что аденантин также реагирует с другими тиолами и гораздо более избирателен для селеноцистеин-зависимой TrxR, вызывая таким образом накопление окисленного Prdx путем ингибирования рециркуляции Trx [62].

Определенно может показаться, что есть противоречие в том, что один и тот же белок выполняет две роли: и выявление, и разрушение оксиданта. Можно предположить, что сочетание высокой реакционной способности, сложного механизма рециркуляции, положительной кооперативности в начальной реакции с окислителем и отрицательной кооперативности в димеризации позволяет 2-Cys Prdxs сочетать эти задачи.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 91, 7017-7021.

- Jacobson, F. S., Morgan, R. W., Christman, M. F., and 5. Ames, B. N. (1989) An alkyl hydroperoxide reductase from Salmonella typhimurium involved in the defense of DNA against oxidative damage. Purification and properties, J. Biol. Chem., 264, 1488-1496.
- Tartaglia, L. A., Storz, G., Brodsky, M. H., Lai, A., and Ames, B. N. (1990) Alkylhydroperoxide reductase from 6. Salmonella typhimurium. Sequence and homology to thioredoxin reductase and other flavoprotein disulfideoxidoreductases, J. Biol. Chem., 265, 10535-10540.
- 7. Chae, H. Z., Chung, S. J., and Rhee, S. G. (1994) Thioredoxin-dependent peroxide reductase from yeast, J. Biol. Chem., 269, 27670-27678.

- Poole, L. B., and Nelson, K. J. (2016) Distribution and features of the six classes of peroxiredoxins, *Mol. Cells*, 39, 53-59.
- 9. Knoops, B., Loumaye, E., and Van Der Eecken, V. (2007) Evolution of the peroxiredoxins, in *Peroxiredoxin systems*. *Subcellular biochemistry*, vol 44, (Flohé, L., and Harris, J. R., eds.) Springer, Dordrecht.
- Harris, J. R. (1969) Some negative staining features of a protein from erythrocyte ghosts, J. Mol. Biol., 46, 329-335.
- Wood, Z. A., Schröder, E., Harris, J. R., and Poole, L. B. (2003) Structure, mechanism and regulation of peroxiredoxins, *Trends Biochem. Sci.*, 28, 32-40.
- Hall, A., Parsonage, D., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2010) Structural evidence that peroxiredoxin catalytic power is based on transition state stabilization, *J. Mol. Biol.*, **402**, 194-209.
- Pedre, B., van Bergen, L. V., Pallo, A., Rosado, L. A., Dufe, V. T., et al. (2016) The active site architecture in peroxiredoxins: a case study on *Mycobacterium tuberculosis* AhpE, *Chem. Commun.*, **52**, 10293-10296.
- 14. Netto, L. E. S., Chae, H. Z., Kang, S.-W., Rhee, S. G., and Stadtman, E. R. (1996) Removal of hydrogen peroxide by thiol-specific antioxidant enzyme (Tsa) is involved with its antioxidant properties: Tsa possesses thiol peroxidase activity, *J. Biol. Chem.*, **271**, 15315-15321.
- 15. Hofmann, B., Hecht, H.-J., and Flohe, L. (2002) Peroxiredoxins, *Biol. Chem.*, **383**, 347-364.
- Dietz, K. J. (2003) Plant peroxiredoxins, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 93-107.
- 17. Bryk, R., Griffin, P., and Nathan, C. (2000) Peroxynitrite reductase activity of bacterial peroxiredoxins, *Nature*, **407**, 211-221.
- Wong, C.-M., Zhou, Y., Ng, R. W. M., Kung, H.-F., and Jin, D.-Y. (2002) Cooperation of yeast peroxiredoxins Tsa1p and Tsa2p in the cellular defense against oxidative and nitrosative stress, *J. Biol. Chem.*, 277, 5385-5394.
- Ogusucu, R., Rettori, D., Munhoz, D. C., Netto, L. E., and Augusto, O. (2007) Reactions of yeast thioredoxin peroxidases I and II with hydrogen peroxide and peroxynitrite: rate constants by competitive kinetics, *Free Radic. Biol. Med.*, 42, 326-334.
- Manta, B., Hugo, M., Ortiz, C., Ferrer-Sueta, G., Trujillo, M., and Denicola, A. (2009) The peroxidase and peroxynitrite reductase activity of human erythrocyte peroxiredoxin 2, *Arch. Biochem. Biophys.*, 484, 146-154.
- De Armas, M. I., Esteves, R., Viera, N., Reyes, A. M., Mastrogiovanni, M., et al. (2019) Rapid peroxynitrite reduction by human peroxiredoxin 3: implications for the fate of oxidants in mitochondria, *Free Radic. Biol. Med.*, 130, 369-378.
- Peskin, A. V., Cox, A. G., Nagy, P., Morgan, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2010) Rapid removal of amino acid, peptide and protein hydroperoxides by reaction with peroxiredoxins 2 and 3, *Biochem. J.*, 432, 313-321.
- Peskin, A. V., Pace, P. E., Behring, J. B., Paton, L. N., Soethoudt, M., Bachschmid, M. M., and Winterbourn, C. C. (2016) Glutathionylation of the active site cysteines of peroxiredoxin 2 and recycling by glutaredoxin, *J. Biol. Chem.*, 291, 3053-3062.
- Chang, T.-S., Jeong, W., Woo, H. A., Lee, S. M., Park, S., and Rhee, S. G. (2004) Characterization of mammalian sulfiredoxin and its reactivation of hyperoxidized peroxiredoxin through reduction of cysteine sulfinic acid in the active site to cysteine, *J. Biol. Chem.*, **279**, 50994-51001.
- 25. Perkins, A., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2014) Tuning of peroxiredoxin catalysis for various physiological roles, *Biochemistry*, **53**, 7693-7705.
- 26. Peskin, A. V., Dickerhof, N., Poynton, R. A., Paton, L. N., Pace, P. E., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C.

(2013) Hyperoxidation of peroxiredoxins 2 and 3: rate constants for the reactions of the sulfenic acid of the peroxidatic cysteine, *J. Biol. Chem.*, **288**, 14170-14177.

- Peskin, A. V., Low, F. M., Paton, L. N., Maghzal, G. J., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2007) The high reactivity of peroxiredoxin 2 with H₂O₂ is not reflected in its reaction with other oxidants and thiol reagents, *J. Biol. Chem.*, 282, 11885-11892.
- Winterbourn, C. C., and Peskin, A. V. (2016) Kinetic approaches to measuring peroxiredoxin reactivity, *Mol. Cells*, **39**, 26-30.
- Carvalho, L. A. C., Truzzi, D. R., Fallani, T. S., Alves, S. V., Toledo, J. C., et al. (2017) Urate hydroperoxide oxidizes human peroxiredoxin 1 and peroxiredoxin 2, *J. Biol. Chem.*, 292, 8705-8715.
- Winterbourn, C. C., and Metodiewa, D. (1999) Reactivity of biologically important thiol compounds with superoxide and hydrogen peroxide, *Free Radic. Biol. Med.*, 27, 322-328.
- Nelson, K. J., Parsonage, D., Hall, A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2008) Cysteine pKa values for the bacterial peroxiredoxin AhpC, *Biochemistry*, 47, 12860-12868.
- Winterbourn, C. C. (2008) Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species, *Nat. Chem. Biol.*, 4, 278-286.
- Schröder, E., Littlechild, J. A., Lebedev, A. A., Errington, N., Vagin, A. A., and Isupov, M. N. (2000) Crystal structure of decameric 2-Cys peroxiredoxin from human erythrocytes at 1.7 Å resolution, *Structure*, 8, 605-615.
- Hall, A., Nelson, K., Poole, L. B., and Karplus, P. A. (2011) Structure-based insights into the catalytic power and conformational dexterity of peroxiredoxins, *Antioxid. Redox Signal.*, 15, 795-815.
- Parsonage, D., Youngblood, D. S., Sarma, G. N., Wood, Z. A., Karplus, P. A., and Poole, L. B. (2005) Analysis of the link between enzymatic activity and oligomeric state in AhpC, a bacterial peroxiredoxin, *Biochemistry*, 44, 10583-10592.
- Nagy, P., Karton, A., Betz, A., Peskin, A. V., Pace, P., et al. (2011) Model for the exceptional reactivity of peroxiredoxins 2 and 3 with hydrogen peroxide: a kinetic and computational study, *J. Biol. Chem.*, 286, 18048-18055.
- Yewdall, N. A., Peskin, A. V., Hampton, M. B., Goldstone, D. C., Pearce, F. G., and Gerrard, J. A. (2018) Quaternary structure influences the peroxidase activity of peroxiredoxin 3, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 497, 558-563.
- Stacey, M. M., Peskin, A. V., Vissers, M. C., and Winterbourn, C. C. (2009) Chloramines and hypochlorous acid oxidize erythrocyte peroxiredoxin 2, *Free Radic. Biol. Med.*, 47, 1468-1476.
- Wood, Z. A., Poole, L. B., and Karplus, P. A (2003) Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling, *Science*, **300**, 650-653.
- Peskin, A. V., Meotti, F. C., de Souza, L. F., Anderson, R. F., Winterbourn, C. C., and Salvador, A. (2020) Intradimer cooperativity between the active site cysteines during the oxidation of peroxiredoxin 2, *Free Radic. Biol. Med.*, 158, 115-125.
- Bolduc, J. A., Nelson, K. J., Haynes, A. C., Lee, J., Reisz, J. A., et al. (2018) Novel hyperoxidation resistance motifs in 2-Cys peroxiredoxins, *J. Biol. Chem.*, **293**, 11901-11912.
- Poynton, R. A., Peskin, A. V., Haynes, A. C., Lowther, W. T., Hampton, M. B., and Winterbourn, C. C. (2016) Kinetic analysis of structural influences on the susceptibility of peroxiredoxins 2 and 3 to hyperoxidation, *Biochem. J.*, 473, 411-421.
- 43. Cheah, F. C., Peskin, A. V., Wong, F.-L., Ithnin, A., Othman, A., and Winterbourn, C. C. (2014) Increased

basal oxidation of peroxiredoxin 2 and limited peroxiredoxin recycling in glucose-6-phosphate dehydrogenasedeficient erythrocytes from newborn infants, *FASEB J.*, **28**, 3205-3210.

- 44. Low, F. M., Hampton, M. B., Peskin, A. V., and Winterbourn, C. C. (2007) Peroxiredoxin 2 functions as a noncatalytic scavenger of low-level hydrogen peroxide in the erythrocyte, *Blood*, **109**, 2611-2617.
- 45. Woo, H. A., Chae, H. Z., Hwang, S. C., Yang, K.-S., Kang, S. W., et al. (2003) Reversible oxidation of the catalytic site of cysteine of peroxiredoxins to cysteine sulfinic acid in mammalian cells, *Science*, **300**, 653-656.
- 46. Biteau, B., Labarre, J., and Toledano, M. B. (2003) ATPdependent reduction of cysteine-sulphinic acid by *S. cerevisiae* sulphiredoxin, *Nature*, **425**, 980-984.
- Jönsson, T. J., Lynnette, C., Johnson, L. C., and Lowther, W. T. (2008) Structure of the sulphiredoxin–peroxiredoxin complex reveals an essential repair embrace, *Nature*, 451, 98-101.
- Chae, H. Z., Kim, H. J., Kang, S. W., and Rhee, S. G. (1999) Characterization of three isoforms of mammalian peroxiredoxin that reduce peroxides in the presence of thioredoxin, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, 45, 101-112.
 Veal, E. A., Underwood, Z. E., Tomalin, L. E., Morgan,
- Veal, E. A., Underwood, Z. E., Tomalin, L. E., Morgan, B. A., and Pillay, C. S. (2018) Hyperoxidation of peroxiredoxins: gain or loss of function? *Antioxid. Redox Signal.*, 28, 574-590.
- 50. Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2015) Signalling via a peroxiredoxin sensor, *Nature Chem. Biol.*, **11**, 5-6.
- Cao, J., Schulte, J., Knight, A., Leslie, N. R., Zagozdzon, A., et al. (2009) Prdx1 inhibits tumorigenesis via regulating PTEN/AKT activity, *EMBO J.*, 28, 1505-1517.
- Jarvis, R. M., Hughes, S. M., and Ledgerwood, E. C. (2012) Peroxiredoxin 1 functions as a signal peroxidase to receive, transduce, and transmit peroxide signals in mammalian cells, *Free Radic. Biol. Med.*, 53, 1522-1530.

- Sobotta, M. C., Liou, W., Stocker, S., Talwar, D., Oehler, M., et al. (2015) Peroxiredoxin-2 and STAT3 form a redox relay for H₂O₂ signaling, *Nat. Chem. Biol.*, 11, 64-70.
- Pace, P. E., Peskin, A. V., Konigstorfer, A., Jasoni, C. J., Winterbourn, C. C., and Hampton, M. B. (2018) Peroxiredoxin interaction with the cytoskeletal-regulatory protein CRMP2: investigation of a putative redox relay, *Free Radic. Biol. Med.*, **129**, 383-393.
- 55. Jang, H. H., Lee, K. O., Chi, Y. H., Jung, B. G., Park, S. K., et al. (2004) Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function, *Cell*, 117, 625-635.
- Teixeira, F., Castro, H., Cruz, T., Tse, E., Koldewey, P., et al. (2015) Mitochondrial peroxiredoxin functions as crucial chaperone reservoir in *Leishmania infantum*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, E616-E624.
 Hanzén, S., Vielfort, K., Yang, J., Roger, F., Andersson, V.,
- Hanzén, S., Vielfort, K., Yang, J., Roger, F., Andersson, V., et al. (2016) Lifespan control by redox-dependent recruitment of chaperones to misfolded proteins, *Cell*, 166, 140-151.
 Kisucka, J., Chauhan, A. K., Patten, I. S., Yesilaltay, A.,
- Kisucka, J., Chauhan, A. K., Patten, I. S., Yesilaltay, A., Neumann, C., et al. (2008) Peroxiredoxin1 prevents excessive endothelial activation and early atherosclerosis, *Circ. Res.*, **103**, 598-605.
- 59. Radyuk, S. N., and Orr, W. C. (2018) The multifaceted impact of peroxiredoxins on aging and disease, *Antioxid. Redox Signal.*, **29**, 1293-1311.
- 60. Forshaw, T. E., Holmila, R., Nelson, K. J., Lewis, J. E., Kemp, M. L., et al. (2019) Peroxiredoxins in cancer and response to radiation therapies, *Antioxidants*, **8**, 11.
- Liu, C. X., Yin, Q. Q., Zhou, H. C., Wu, Y. L., Pu, J. X., et al. (2012) Adenanthin targets peroxiredoxin I and II to induce differentiation of leukemic cells, *Nat. Chem. Biol.*, 8, 486-493.
- Soethoudt, M., Peskin, A. V., Dickerhof, N., Paton, L. N., Pace, P. E., and Winterbourn, C. C. (2014) Interaction of adenanthin with glutathione and thiol enzymes: Selectivity for thioredoxin reductase and inhibition of peroxiredoxin recycling, *Free Radic. Biol. Med.*, 77, 331-339.

THE ENIGMA OF 2-Cys PEROXIREDOXINS: WHAT ARE THEIR ROLES?

Review

A. V. Peskin* and C. C. Winterbourn

Centre for Free Radical Research, University of Otago Christchurch, 8140 Christchurch, New Zealand, E-mail: alexander.peskin@otago.ac.nz

2-Cys peroxiredoxins are abundant thiol proteins that react efficiently with a wide range of peroxides. Unlike other enzymes, their exceptionally high reactivity does not rely on cofactors. The mechanism of oxidation and reduction of peroxiredoxins places them in a good position to act as antioxidants as well as key players in redox signaling. Understanding of the intimate details of peroxiredoxin functioning is important for translational research.

Keywords: peroxiredoxin, thiols, redox, signaling, peroxide
УДК 577.355.3

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ АСПЕКТЫ ТЕРМОРЕГУЛЯЦИИ ЭЛЕКТРОННОГО ТРАНСПОРТА И СИНТЕЗА АТР В ХЛОРОПЛАСТАХ

Обзор

© 2021 А.В. Вершубский, А.Н. Тихонов*

Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, 119991 Москва, Россия; электронная почта: an tikhonov@mail.ru

> Поступила в редакцию 28.10.2020 После доработки 29.11.2020 Принята к публикации 05.12.2020

Обзор посвящен анализу механизмов температурной регуляции электронного транспорта и синтеза ATP в хлоропластах высших растений. Функциональное значение терморегуляции фотосинтеза определяется тем, что растения являются эктотермными организмами, у которых собственная температура зависит от температуры окружающей среды. В обзоре рассмотрено влияние температуры на следующие процессы, протекающие в тилакоидных мембранах: 1) активность фотосистемы 2 и восстановление пластохинона; 2) перенос электронов от пластохинола (через цитохромный $b_6 f$ -комплекс и пластоцианин) к фотосистеме 1; 3) трансмембранный перенос протонов; 4) синтез ATP. Приведены данные о взаимосвязи между функциональными свойствами (фотосинтетический перенос электронов и протонов, функционирование ATP-синтазы) и структурными характеристиками хлоропластов (микровязкость липидного бислоя тилакоидной мембраны), полученными методом электронного парамагнитного резонанса.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фотосинтез, хлоропласты, электронный транспорт, тилакоидные мембраны, регуляция.

DOI: 10.31857/S0320972521010097

введение

У растений фотосинтез происходит в хлоропластах – энергопреобразующих органеллах растительной клетки, которые, используя энергию света, поглощаемого светособирающими антеннами фотосистемы 1 (ФС1) и фотосистемы 2 (ФС2), усваивают углекислый газ (СО₂) и выделяют молекулярный кислород (О₂). Энергия поглощенных квантов света мигрирует к фотореакционным центрам ФС1 и ФС2, в которых происходит разделение зарядов и инициируется перенос электронов по цепи электронного транспорта (ЦЭТ) [1, 2]. От молекул воды, разлагаемых водоокисляющим комплексом (ВОК) ФС2 (2H₂O \rightarrow O₂ + 4e⁻ + 4H⁺), электроны пере-

* Адресат для корреспонденции.

носятся к NADP⁺, терминальному акцептору электронов ФС1, восстанавливаемому до NADPH (NADP⁺ + 2e⁻ + H⁺ \rightarrow NADPH). Перенос электронов по ЦЭТ сопряжен с созданием *транс*-тилакоидной разности электрохимических потенциалов протонов $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ (называемой «протон-движущей силой»), являющейся источником энергии для работы ATP-синтазы [3, 4]. В хлоропластах основной вклад в генерацию $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ вносит *транс*-тилакоидная разность pH, $\Delta pH = pH_{out} - pH_{in}$, где pH_{out} и pH_{in} – значения pH стромы и внутритилакоидного пространства. NADPH и ATP – макроэргические продукты светоиндуцированных стадий фотосинтеза – используются в реакциях цикла Кальвина–Бенсона (ЦКБ) для фиксации CO₂ [5].

Электрон-транспортные комплексы (Φ C1, Φ C2) и ATP-синтазы (CF₀–CF₁) неравномерно распределены между гранальными и стромальными тилакоидами [6, 7]. Тилакоиды гран обогащены комплексами Φ C2; большинство Φ C1 и CF₀–CF₁ комплексов сосредоточено в межгранных тилакоидах, на краях и торцах гран, экспонированных в строму. Цитохромные b_6f -комплексы распределены равномерно вдоль тилако-

Принятые сокращения: Φ С1 и Φ С2 – фотосистемы 1 и 2; P_{700} и P_{680} – первичные доноры электрона в Φ С1 и Φ С2; ЦЭТ – цепь электронного транспорта; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс; Chl – хлорофил; DGDG – дигалактозилдиацилглицерин; Fd – ферредоксин; ISP – железо-серный белок; MGDG – моногалактозилдиацилглицерин; Pc – пластоцианин; Phe – феофитин; PQ – пластохинон; PQH₂ – пластохинол.

идных мембран [8]. В работе цепи переноса электронов между Φ C2 и Φ C1 участвуют мобильные переносчики — пластохинон (PQ) и пластоцианин (Pc), которые обеспечивают связь между удаленными электрон-транспортными комплексами. Молекулы пластохинола (PQH₂), образующиеся в Φ C2, переносят электроны к b_6f -комплексам, которые, в свою очередь, восстанавливают молекулы пластоцианина. Восстановленные молекулы пластоцианина (Pc⁻) диффундируют во внутреннем пространстве тилакоидов, называемом люменом, обеспечивая перенос электронов от b_6f -комплекса к окисленным центрам Φ C1 (P⁺₇₀₀).

Перенос электронов по ЦЭТ между ФС2 и ФС1 и реакции синтеза АТР чувствительны к структурным изменениям в тилакоидных мембранах хлоропластов, вызванных изменениями температуры. Важное функциональное значение терморегуляции фотосинтетических процессов в хлоропластах определяется тем, что растения являются пойкилотермными (эктотермными) организмами, у которых их собственная температура зависит от температуры окружающей среды. Термоиндуцированные структурные перестройки тилакоидных мембран влияют на активность фотосинтетических белковых комплексов, подвижность мобильных переносчиков электрона и генерацию $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$. Для выяснения взаимосвязи между структурными изменениями тилакоидных мембран и функциональными свойствами хлоропластов представляется интересным сравнить влияние температуры на физическое состояние («текучесть») тилакоидных мембран и на процессы электронного транспорта и синтеза АТР в хлоропластах. В обзоре приведены данные о роли тилакоидных мембран в терморегуляции фотосинтеза и о взаимосвязи между функциональными свойства хлоропластов (фотосинтетический перенос электронов и протонов и работа АТР-синтазы) и структурным состоянием мембранных липидов.

СТРУКТУРНО-ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ОРГАНИЗАЦИЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКОГО АППАРАТА ХЛОРОПЛАСТОВ

Липидный бислой тилакоидной мембраны. В хлоропластах пигмент-белковые комплексы ФС1 и ФС2 встроены в тилакоидные мембраны, образующие систему замкнутых везикул – тилакоидов. Тилакоиды окружены двуслойной оболочкой, отделяющей хлоропласт от цитоплазмы растительной клетки. Стопки уплощенных тилакоидов образуют граны, которые связаны друг с другом посредством межгранных тилакоидов, выступающих из тилакоидов гран. Тилакоидные мембраны плотно насыщены белковыми комплексами, которые составляют ~70% от общей массы мембран. Физико-химические свойства мембранного бислоя определяются составом липидов [9, 10]. В мембранах хлоропластов присутствует β-токоферол, который повышает структурированность мембран и их устойчивость к свободнорадикальным процессам. Липиды тилакоидов представлены галактолипидами (нейтральными липидами), фосфолипидами и сульфолипидами. В тилакоидах имеются липиды четырех основных типов: моногалактозилдиацилглицерин (MGDG), дигалактозилдиацилглицерин (DGDG). сульфохиновозилдиацилглицерин (SQDG) и фосфатидилглицерин (PG). Глицеролипиды содержат два жирнокислотных остатка, связанных с глицерином. MGDG и DGDG - основные «строительные блоки» тилакоидной мембраны, которые формируют матрицу, в которую встроены белковые комплексы. Липидный бислой служит не только «изолятором», отделяющим внутреннее пространство тилакоидов (люмен) от стромы, но также является средой, в которой диффундируют молекулы пластохинона. Липиды (прежде всего, MGDG и SQDG) участвуют в поддержании димерной структуры пигмент-белковых комплексов ФС1 и ФС2. Они также обнаружены в полости цитохромного $b_6 f$ комплекса, внутри которой находится хинонсвязывающий центр [11].

Цепь электронного транспорта в хлоропластах. На рис. 1 показана схема, иллюстрирующая расположение электрон-транспортных комплексов в тилакоидной мембране и их взаимодействие, обеспечивающее перенос электронов от H₂O к NADP⁺ (нециклический электронный транспорт) или к О2 (псевдоциклический электронный транспорт). Транспорт электронов между ФС2 и ФС1 включает следующие стадии: 1) перенос электронов из ФС2 к *b*₆*f*-комплексу за счет диффузии в мембране молекул пластохинола и 2) перенос электронов от $b_6 f$ -комплекса к ФС1 за счет пластоцианина, диффундирующего внутри люмена. Скорость переноса электронов между фотосистемами определяется временем оборота пластохинона, взаимодействующего с Φ С2 и $b_6 f$ -комплексом [11–15]. Пластохинонзависимые процессы включают в себя: 1) фотоиндуцированное восстановление PQ до PQH₂ в Φ C2, 2) диффузию PQH₂ в мембране и его проникновение внутрь $b_6 f$ -комплекса, 3) окисление PQH₂ в «о»-центре и восстановление PQ в «і»центре $b_6 f$ -комплекса. В широком диапазоне условий (pH, температура) образование PQH₂ и его диффузия в мембране происходят быстрее,

чем окисление PQH_2 внутри b_6f -комплекса [16, 17].

Фотосистема 1 обеспечивает перенос электронов от восстановленного пластоцианина (Рс⁻) к расположенным в строме молекулам ферредоксина (Fd) [1, 2, 13, 18, 19]. Индуцированное светом возбуждение Р₇₀₀ (первичный донор электрона) инициирует разделение зарядов: возбужденный центр P_{700}^* быстро отдает электрон первичному акцептору электрона. Акцепторы электрона расположены в виде двух квазисимметричных ветвей: две молекулы хлорофилла (Chl_{2A} и Chl_{3A}) и одна молекула филлохинона (А_{1А}) принадлежат к ветви А; две другие молекулы Chl (Chl_{2B} и Chl_{3B}) и вторая молекула филлохинона (А1В) принадлежат к ветви В. Ветви А и В сходятся вблизи акцептора F_x (кластер [FeS]₄). Индуцированный светом перенос электрона в ФС1 не требует пространственного перемещения переносчиков и может происходить даже при низких (криогенных) температурах по механизму квантово-механического туннелирования [20, 21]. Восстановленный акцептор F_X передает электрон через два редокс-центра F_A и F_B к молекуле ферредоксина, находящейся в строме ($F_X \rightarrow F_A \rightarrow F_B \rightarrow Fd$). Восстановленные молекулы ферредоксина (Fd⁻) передают электроны ферредоксин-NADP-редуктазе (FNR), обеспечивая восстановление NADP⁺ до NADPH.

Окисленный центр Р₇₀₀ принимает электрон от Рс⁻, восстановленного $b_6 f$ -комплексом. Диффундируя во внутритилакоидном пространстве, Рс- обеспечивает перенос электронов между удаленными комплексами $b_6 f$ и Φ C1. При определенных условиях (например, в хлоропластах, адаптированных к темноте) стерические ограничения могут препятствовать перемещению молекул Рс⁻ внутри узкого (~ 4–5 нм) пространства люмена [22]. Толщина люмена увеличивается при освещении хлоропластов, благодаря чему латеральная диффузия Рс- перестает лимитировать перенос электронов от $b_6 f$ -комплексов к ФС1 [22]. Латеральная диффузия Pc⁻ и его окисление за счет ФС1 происходят быстрее $(\tau_{1/2} < 200 \text{ мкс при комнатной температуре [13]}),$ чем перенос электронов от ФС2 к пластохинону и его взаимодействие с *b*₆*f*-комплексом $(\tau_{1/2} \ge 4 - 20 \text{ mc}) [23, 24].$



Рис. 1. Схема расположения Φ C1, Φ C2 и b_6f -комплекса в тилакоидной мембране. Красными и синими стрелками показаны пути переноса электронов и протонов. F_X , F_A и F_B – железо-серные центры в Φ C1; Phe_A и Phe_B – молекулы феофитина; PQ и PQH₂ – окисленная и полностью восстановленная формы пластохинона; PQ_A и PQ_B – молекулы первичного и вторичного пластохинона, связанного с Φ C2 (см. также список сокращений и пояснения в тексте). Центр связывания PQH₂ «о» расположен между гемом b_6^L и (Fe-S)₂-кластером белка Риске. Центр связывания PQ «i» расположен между гемом b_6^L и гемом c_i . Изображения молекулярных структур b_6f -комплекса (PDB код 1Q90, [70]) и Φ C1 (PDB код 1JB0, [88]) построены с помощью пакета программ Accelrys DV (http://www.accelrys.com). (С цветными вариантами рис. 1, 2, 4 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.)

Фотосистема 2 работает как вода/пластохинон-оксидоредуктаза: два электрона переносятся от H_2O к PQ, восстанавливаемому до PQH₂, при этом два иона водорода поглощаются из стромы и два иона водорода выделяются в люмен в результате разложения воды ($H_2O \rightarrow$ \rightarrow SO₂ + 2H_{in}⁺ + 2e⁻) [25–27]. Специальная пара молекул Chl a, встроенная в ядро белкового комплекса ФС2, образует первичный донор электрона, Р₆₈₀. На акцепторной стороне ФС2 имеются две ветви кофакторов электронного переноса, ветви А и В. Возбужденный центр Р^{*}₆₈₀ передает электрон первичному акцептору электрона А-ветви (Chl_{D1}), который восстанавливает вторичный акцептор электрона – феофитин (Phe): $P_{680}^* \rightarrow Chl_{D1} \rightarrow Phe_A$. Восстановленный Phe_A передает электрон первичному пластохинону PQ_A , прочно связанному с $\Phi C2$; $PQ_A^$ восстанавливает вторичный пластохинон PQ_в $(PQ_{A}^{-}PQ_{B} \rightarrow PQ_{A}PQ_{B}^{-})$. Следующий электрон, донируемый возбужденным центром Р*680, переходит к PQ_B, обеспечивая полное восстановление PQ_B до PQ_B^{2-} . После протонирования PQ_B^{2-} за счет ионов водорода, поступающих из стромы $(PQ_B^{2-} + 2H_{out}^+ \rightarrow PQ_BH_2)$, молекула пластохинола диссоциирует в липидную фазу тилакоидной мембраны, а ее место занимает окисленная молекула PQ (PQ_BH₂ + PQ \rightarrow PQ_B + PQH₂).

Цитохромный b₆f-комплекс (пластохинолпластоцианин-оксиредуктаза) - связующее звено, обеспечивающее перенос электронов между ФС2 и ФС1 [11, 17]. Диффундируя в мембране, молекула PQH_2 достигает b_6f -комплекс и связывается с каталитическим участком Q₀, расположенным внутри этого комплекса. Цитохромный $b_6 f$ -комплекс организован как функциональный димер. Каталитические функции каждого из мономеров осуществляются за счет четырех окислительно-восстановительных центров: железосерного кластера (Fe-S)₂ белка Риске (ISP), двух гемов цитохрома b_6 (низко- и высокопотенци-альные гемы b_6^L и b_6^H), а также цитохрома f. Молекула PQH₂ проникает в хинол-связывающий портал каталитического сайта Q_o, расположенный между субъединицами цитохрома b_6 и железо-серного белка. Центр Q₀ ориентирован в направлении люменальной стороны тилакоидной мембраны. Молекула PQH₂ отдает два электрона $b_6 f$ -комплексу, при этом два протона диссоциируют во внутритилакоидное пространство.

Согласно механизму Q-цикла Митчелла [28–30], окисление PQH₂ представляет собой «бифуркационную» реакцию. В хинон-связывающем центре «о», расположенном ближе к люменальной стороне мембраны, один электрон от молекулы PQH₂ переносится на (Fe-S)₂-кластер белка Риске. Затем этот электрон поступает к пластоцианину (через цитохром *f*): $PQH_2 \rightarrow$ \rightarrow ISP \rightarrow Cyt $f \rightarrow$ Pc. Другой электрон поступает от PQH₂ к низкопотенциальному гему b_6^L , а затем переносится на высокопотенциальный гем $b_{6}^{\rm H}$, который, в свою очередь, восстанавливает молекулу PQ в хинон-связывающем центре «і», расположенном на стромальной стороне $b_6 f$ -комплекса ($b_6^L \rightarrow b_6^H \rightarrow PQ$) [29, 30]. Двукратное восстановление молекулы PQ до PQH₂ в Q_iцентре сопровождается присоединением двух протонов из стромы (PQ + $2e^- + 2H_{out}^+ \rightarrow PQH_2$). Образовавшаяся молекула PQH₂ уходит из Q_iцентра и перемещается к вакантному Q_0 -центру, где происходит ее окисление, сопровождающееся выделением двух протонов в люмен. Таким образом, $b_6 f$ -комплекс функционирует как протонный насос, осуществляющий перенос протонов из стромы в люмен. Благодаря этому в люмен закачивается два протона в расчете на один электрон, перенесенный к Φ C1, H⁺/e⁻ = 2 [28–31]. Имеются веские основания считать, что скорость окисления РОН₂ определяется первой стадией окисления РОН₂ [32-35]. В частности, квантово-химические расчеты показывают [36], что энергетический барьер этой реакции $E_{\rm a} \approx 60$ кДж/моль близок к эффективной энергии активации для переноса электрона от PQH_2 на P_{700}^+ . Депротонирование восстановленного железо-серного белка ($ISP_{red}H^+ \rightarrow ISP_{red} +$ $+ H_{in}^+$) и перенос электрона от ISP_{red} к цитохрому f обеспечивают условия для циклического функционирования $b_6 f$ -комплекса.

Липиды тилакоидной мембраны играют важную роль в функционировании $b_6 f$ -комплекса. В тилакоидах большинство липидов представлено галактолипидами, которые содержат полиненасыщенные жирные кислоты [9, 10, 37, 38]. Изменения в содержании ненасыщенных жирных кислот являются одним из ключевых факторов, контролирующих фотосинтетическую активность хлоропластов [39-41]. Внутри $b_6 f$ -комплекса имеется полость (30 Å × 15 Å × \times 25 A), в которую проникает молекула пластохинола [11]. Внутри этой полости имеются 23 липид-связывающих участка в расчете на один мономер димерного b₆f-комплекса из Noctos PCC 7120 [42]. Предполагается, что эти липиды могут определять повышенную конформационную гибкость мобильного домена ISP, несущего (Fe-S)₂-кластер. Как было предположено ранее [17, 30], влияние липидов на скорость окисления пластохинола может быть опосредовано тем, что скорость диссоциации протонов и их выход в люмен контролируется состоянием липидного слоя, примыкающего к *b*₆*f*-комплексу. «Затвердевание» или «разжижение» липидного бислоя, зависящее от со-

става липидов и температуры, может влиять на скорость диссоциации протонов в люмен, благодаря чему будет изменяться скорость окисления PQH_2 . Уменьшение барьера, препятствующего диссоциации протонов, должно способствовать окислению PQH_2 и тем самым ускорять перенос электронов к $\PhiC1$.

Диффузионно-контролируемые стадии переноса электронов. Диффузия пластохинола в мембране и перемещение пластоцианина во внутритилакоидном пространстве - ключевые стадии переноса электронов между удаленными белковыми комплексами: $\Phi C2 \rightarrow PQH_2 \rightarrow b_6 f \rightarrow$ \rightarrow Pc \rightarrow Φ C1. Окисление PQH₂ цитохромным *b*₆*f*-комплексом – самая медленная стадия в цепи переноса электронов от ФС2 к ФС1 [12, 13]. В широком диапазоне экспериментальных условий (рН, ионная сила, температура) процессы восстановления PQ до PQH₂ в ФС2 и диффузия PQH₂ к $b_6 f$ -комплексу происходят быстрее, чем окисление PQH₂, протекающее после проникновения PQH₂ внутрь цитохромного комплекса и его связывания с хинон-связывающим центром «о» [16, 17, 23, 24]. Несмотря на то, что перенос электронов к $b_6 f$ -комплексу может затрудняться из-за стерических ограничений в мембране, препятствующих диффузии PQH₂ [14], имеются веские основания считать, что латеральная диффузия PQH₂ не лимитирует общую скорость переноса электронов между фотосистемами. Несмотря на то, что комплексы ФС2 и ФС1 могут быть удалены друг от друга, большинство из них находится вблизи от $b_6 f$ комплексов, равномерно распределенных вдоль тилакоидной мембраны [8]. Близкое расположение $\Phi C2$ и $b_6 f$ -комплексов, локализованных в тилакоидных мембранах гран, минимизирует среднее расстояние, пройденное молекулами пластохинона, обеспечивая быстрый обмен PQH_2 и PQ между $\Phi C2$ и $b_6 f$ -комплексами [14].

Диффузия Pc⁻ внутри люмена, как известно, в большинстве случаев также не лимитирует общую скорость переноса электронов между фотосистемами: перенос электронов от $b_6 f$ -комплексов к Рс- и диффузия Рс- к ФС1 происходят заметно быстрее по сравнению с окислением PQH₂ цитохромным $b_6 f$ -комплексом [12, 13, 43, 44]. Как было показано в работе Kirchhoff et al. [22], при определенных условиях (например, в хлоропластах, адаптированных к темноте) стерические ограничения, затрудняющие диффузию Рс в узком просвете люмена, могут замедлять перенос электронов между удаленными $b_6 f$ комплексом и ФС1. Плотно расположенные комплексы ФС2 с водорасщепляющими доменами, выступающими в просвет люмена, ограничивают пространство для миграции молекул Рс,

8 БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

размеры которых составляют ~ $4 \times 3 \times 3$ нм. Для эффективной диффузии Pc зазор между противоположными краями выступающих из мембран водорасщепляющих комплексов должен быть не менее 3 нм. После набухания тилакоидов, происходящего при освещении хлоропластов, просвет люмена может увеличиваться вдвое, при этом наблюдается заметное ускорение окисления цитохрома *f*, обусловленное ускорением диффузии Pc внутри люмена [22].

рН-Зависимая регуляция электронного транспорта. Скорость окисления PQH₂ цитохромным комплексом контролируется значением рН люмена (pH_{in}). Светоиндуцируемое закисление люмена, как известно [16, 45, 46], замедляет поток электронов между $\Phi C2$ и $\Phi C1$. Хорошо изучены два механизма рН-зависимой регуляции электронного транспорта в хлоропластах: 1) замедление окисления PQH₂ b₆f-комплексом, вызванное понижением pH_{in} [16, 45-47], и 2) ослабление активности ФС2 за счет усиления теплового рассеяния энергии в светособирающей антенне ФС2, известного как нефотохимическое тушение возбуждения хлорофилла [48–50]. С механизмом рН-зависимой регуляции электронного транспорта связано явление «метаболического» контроля, заключающееся в том, что поток электронов между фотосистемами зависит от «фосфатного потенциала», P = [ATP]/ /([ADP] × [P_i]), где [ATP], [ADP] и [P_i] – концентрации АТР, АDP и P_i. В зависимости от фосфатного потенциала АТР-синтаза функционирует в режиме синтеза АТР либо в режиме АТРазы (гидролиз АТР). В состоянии «фотосинтетического контроля» («состояние 4» по Chance и Williams [51]), когда исчерпаны пулы молекул ADP и/или P_i, скорость синтеза ATP и поток протонов через $CF_0 - CF_1$ ослабевают, а потому происходит достаточно сильное закисление люмена (pH_{in} < 6), вызывающее замедление электронного транспорта между ФС2 и ФС1 [16, 47]. В «состоянии 3» (интенсивный синтез АТР) скорость переноса электронов транспорта высока. В этом случае функционирование АТР-синтазы сопровождается выходом протонов из люмена в строму, а потому не происходит столь сильного закисления люмена ($pH_{in} \ge 6$), которое могло бы вызывать торможение электронного транспорта между фотосистемами [16, 47].

ВЛИЯНИЕ ТЕМПЕРАТУРЫ НА ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИЕ ПРОЦЕССЫ В ХЛОРОПЛАСТАХ

Фотосинтетический аппарат растений чувствителен к изменениям окружающей среды.

Важную роль в адаптации фотосинтетического аппарата растений к изменениям условий окружающей среды играют явления, связанные с «краткосрочными» и «долгосрочными» изменениями свойств хлоропластов в ответ на изменения температуры [50, 52, 53]. Структурные перестройки липидных областей тилакоидных мембран – один из ключевых факторов, определяющих адаптацию фотосинтетического аппарата при изменениях температуры. Особую роль в терморегуляции энергетических процессов в хлоропластах играют изменения свойств тилакоидных мембран (соотношение насыщенных и ненасыщенных липидов), которые определяют микровязкость липидных доменов тилакоидных мембран [54, 55]. MGDG и DGDG – основные липиды тилакоидных мембран – содержат большое количество полиненасыщенных жирных кислот, что определяет пониженную микровязкость (высокую «текучесть») липидного бислоя. Адаптация фотосинтетического аппарата к низким (или высоким) температурам может происходить за счет увеличения (или уменьшения) степени десатурации жирных кислот в галактолипидах [39-41, 54, 55]. Изменения состава липидов проявляются в температурных зависимостях физических характеристик липидных мембран [56].

Соотношение между липидами разного состава - один из ключевых факторов, определяющих микровязкость мембранных липидов и их подвижность [57]. Мембраны с более высокой долей липидов, содержащих ненасыщенные жирные кислоты, имеют более низкую температуру «плавления» по сравнению с мембранами, содержащими насыщенные жирные кислоты. Соотношение насыщенных и ненасыщенных жирных кислот изменяется в зависимости от условий культивирования растений [58]. Микровязкость мембранных липидов является своеобразным «датчиком», который запускает ретроградные сигналы, контролирующие, например, экспрессию десатураз, тем самым адаптируя мембрану к температуре окружающей среды и оптимизируя преобразование энергии в фотосинтезирующих организмах [39-41].

При анализе температурных зависимостей различных фотосинтетических процессов часто сравнивают данные кинетических и структурных исследований в координатах Аррениуса (зависимость логарифма измеряемой величины от обратной температуры, T^{-1}), на основании которых определяют эффективные значения энергии активации. Примечательно, что большинство графиков Аррениуса, характеризующих различные реакции фотосинтеза, имеют характерные изломы или разрывы, которые интерпретируются как показатели структурных пере-

строек в мембранах [59–61]. Неоднозначные оценки энергий активации процессов электронного транспорта, встречающиеся в литературе, могут быть обусловлены неоднородностью биологического материала (например, разные виды растений или неодинаковые условия их культивирования).

Влияние температуры на электронный транспорт между фотосистемами и структурное состояние тилакоидной мембраны. На рис. 2, а изображена схема цепи переноса электронов от $\Phi C2$ к ФС1 и показаны температурные зависимости ключевых процессов, определяющих функционирование ЦЭТ между фотосистемами – срабатывание $\Phi C2$ и перенос электронов от PQH₂ к P_{700}^+ . На рис. 2, *б*-*г* изображены температурные зависимости процессов, отражающих фотохимическую активность $\Phi C2$ (б), перенос электронов от $\Phi C2$ к PQ (в) и перенос электронов от РОН₂ к ФС1 (через цитохромный комплекс и Рс) (г). Эти зависимости были получены на основании исследований кинетики фотоиндуцированных редокс-превращений Р₇₀₀ в изолированных хлоропластах бобов класса Б, функционирующих в условиях псевдоциклического транспорта электронов: $H_2O \rightarrow \Phi C2 \rightarrow PQH_2 \rightarrow$ $\rightarrow b_6 f \rightarrow Pc \rightarrow \Phi C1 \rightarrow O_2 \rightarrow H_2O$. Результаты этих исследований подробно описаны ранее [24, 47, 62–65].

Использование метода электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) для изучения электронного транспорта в хлоропластах основано на том, что окисленные центры Р⁺₇₀₀ дают характерный сигнал ЭПР, по интенсивности которого можно следить за кинетикой окислительно-восстановительных превращений P₇₀₀. Дальний красный свет ($\lambda > 700$ нм), возбуждающий преимущественно ФС1, индуцирует окисление Р₇₀₀. О работе ФС2 можно судить, измеряя количество электронов, поступающих в ЦЭТ в ответ на действие импульсов света различной длительности [24, 47, 62-66]. Относительное число электронов, поступающих в ЦЭТ в ответ на вспышки белого света, возбуждающего обе фотосистемы, характеризует активность ФС2. Короткий импульс света ($\tau_{\rm S} = 7$ мкс) обеспечивает однократное срабатывание ФС2. Так можно оценить влияние температуры на эффективность функционирования ФС2. Как видно из рис. 2, б, активность ФС2 слабо зависит от температуры в области 0-25 °C, но падает до нуля с повышением температуры до 45 °С.

Длительный импульс белого света ($\tau_{\rm S} = 750$ мкс) вызывает многократное срабатывание ФС2, что позволяет оценить скорость переноса электронов от ФС2 к РQ. В качестве параметра, характеризующего перенос электронов



Рис. 2. Схема фотосинтетических процессов переноса электронов и протонов и расположения четырех основных белковых комплексов (фотосистемы 1, фотосистемы 2, цитохрома $b_6 f$ и ATP-синтазы) в тилакоидной мембране (*a*). Красными стрелками показаны реакции переноса электронов, синими – пути переноса протонов. $\delta - e$ – Показывает влияние температуры на разные реакции переноса электронов по ЦЭТ: активность $\Phi C2$ (δ), скорость восстановления PQ (e) и скорость переноса электронов от PQH₂ к $\Phi C1$ (e). Графики построены по материалам исследований электронного транспорта в хлоропластах бобов класса Б, функционирующих в условиях псевдоциклического транспорта электронов: H₂O $\rightarrow \Phi C2 \rightarrow \Phi C1 \rightarrow$ метилвиологен $\rightarrow O_2 \rightarrow H_2O$. Условия проведения экспериментов описаны ранее [24, 47, 62–65]

к PQ, можно использовать величину $f = W_2/W_1$, равную отношению количества электронов, поступающих в ЦЭТ за время действия длительной (W_2) и короткой (W_1) вспышек света [47, 62, 63, 66]. Из рис. 2, в видно, что относительное число молекул PQH₂, образующихся в ответ на длительные вспышки, увеличивается с ростом температуры. Это означает, что скорость восстановления PQ, оцениваемая по величине f, возрастает с повышением температуры. Обращает на себя внимание характерный излом температурной зависимости параметра f, четко выраженный при 25 °C.

На рис. 2, г показана температурная зависимость кинетического параметра $\tau_{1/2}^{-1}$, характеризующего скорость переноса электронов от PQH₂ к окисленным центрам P⁺₇₀₀ ($\tau_{1/2}$ – время полувосстановления P⁺₇₀₀ после окончания действия белого света). Видно, что с ростом температуры до 25 °C скорость восстановления P⁺₇₀₀ возрастает, затем $\tau_{1/2}^{-1}$ изменяется сравнительно слабо. Учитывая, что скорость восстановления P⁺₇₀₀ определяется скоростью окисления PQH₂ [67], можно утверждать, что температурная зависимость параметра $\tau_{1/2}^{-1}$ отражает влияние температуры на скорость окисления PQH₂. Обращает на себя внимание тот факт, что эта зависимость также имеет характерный излом при 25 °C. Однако, в отличие от температурной, зависимость для скорости образования PQH₂ (рис. 2, *в*), параметр $\tau_{1/2}^{-1}$ заметно возрастает с ростом температуры до 25 °C, но слабо изменяется при температурах выше 25 °C (рис. 2, *г*).

Трансмембранный перенос протонов. Наличие характерных «изломов» на температурных зависимостях параметров, характеризующих перенос электронов по ЦЭТ между фотосистемами (рис. 2), служит отражением влияния температуры на состояние липидной мембраны. Об этом, в частности, свидетельствует тот факт, что подобные особенности проявляются также при изучении переноса протонов через тилакоидную мембрану. Рассмотрим в качестве иллюстрации данные по кинетике фотоиндуцированного поглощения протонов хлоропластами и их выхода наружу из хлоропластов в темноте. На



Рис. 3. Пассивный перенос протонов через тилакоидную мембрану хлоропластов. a – Кинетика фотоиндуцированных изменений рН в суспензии хлоропластов в метаболическом состоянии 4; δ – температурная зависимость поглощения протонов (параметр Δ H⁺); e – температурная зависимость пассивного потока протонов. Экспериментальные значения кинетических параметров, использованные для построения графиков, заимствованы из ранее опубликованной работы [64]

рис. 3, а показана кинетика фотоиндуцированного защелачивания (pH_{out} ↑) суспензии хлоропластов бобов в «состоянии 4», когда не происходит синтеза АТР [64]. Из рис. 3, б видно, что поглощение протонов (ΔH^+) растет с повышением температуры в диапазоне 0-25 °C, но затем монотонно уменьшается. Такая зависимость объясняется наложением двух эффектов: (1) активацией процессов переноса протонов в люмен вследствие работы ЦЭТ и (2) ускорением утечки протонов из люмена вследствие «разрыхления» тилакоидной мембраны при достаточно высоких температурах. На рис. 3, в показана температурная зависимость скорости утечки протонов из тилакоидов (параметр J_{pass}). Значения J_{pass} были определены как $J_{\text{pass}} \sim 1/\tau_{1/2}$, где $\tau_{1/2}$ – время полуспада р H_{out} после выключения света (рис. 3, а). Видно, что температурная зависимость J_{pass} имеет характерный излом при 25 °C: выход протонов из тилакоидов заметно ускоряется с ростом температуры до 25 °С, при более высоких температурах скорость утечки протонов возрастает, но значительно слабее.

Влияние температуры на работу ЦЭТ и процессы трансмембранного переноса протонов может быть связано со структурными изменениями в липидных областях тилакоидной мембраны. Изменение температуры может влиять на микровязкость липидных областей мембраны, ускоряя (или замедляя) диффузию молекул PQ и PQH₂ в липидной части мембраны. Скорость окисления PQH₂ внутри $b_6 f$ -комплекса также может контролироваться состоянием тилакоидной мембраны, поскольку окисление PQH₂ – это процесс, сопряженный с высвобождением двух протонов во внутритилакоидное пространство. Ускорение или замедление диссоциации протонов от PQH_2 в люмен должно влиять на скорость окисления PQH_2 .

Окисление пластохинола определяет скорость переноса электронов между фотосистемами. Экспериментальные данные показывают, что в диапазоне температур 0-45 °C время переноса электронов между фотосистемами определяется главным образом процессами окисления PQH₂ в $b_6 f$ -комплексе, в то время как скорость образования PQH₂ и его диффузии к $b_6 f$ -комплексу остаются более быстрыми, чем перенос электронов от PQH₂ к $b_6 f$ -комплексу и далее к P⁺₇₀₀. Это следует из сравнения температурных зависимостей кинетических параметров, отражающих образование PQH₂ и его диффузию к $b_6 f$ -комплексу, с одной стороны, и скорость переноса электронов от PQH₂ к Φ C1, с другой стороны (рис. 4). Данные зависимости были получены при изучении кинетики восстановления P_{700}^+ в ответ на вспышки белого света, подаваемые на фоне дальнего красного света с длиной волны $\lambda_{\text{макс}} = 707$ нм (см. схему опыта на рис. 4, а). Видно, что восстановление Р₇₀₀ после действия вспышки света происходит с задержкой (рис. 4, б). Длительность лаг-фазы (параметр $\Delta \tau$) определяется временем образования пластохинола в ФС2 и его диффузии к b₆f-комплексу (рис. 4, в). Параметр $\Delta \tau$ возрастает с понижением температуры, что свидетельствует о замедлении этих процессов при охлаждении хлоропластов. Важно отметить, однако, что во всем интервале исследуемых

температур длительность лаг-фазы была заметно короче характерного времени восстановления P_{700}^+ (параметр $\tau_{1/2}$), определяемого переносом электронов от PQH₂ к $b_6 f$ -комплексу. Таким образом, мы можем утверждать, что именно скорость окисления PQH₂, связанного с $b_6 f$ -комплексом, является стадией, лимитирующей перенос электронов между фотосистемами.

Температурная зависимость кинетического параметра $\tau_{1/2}$, как видно из рис. 4, *г*, имеет характерный излом при температуре $t_0 \approx 22-25$ °C. При температурах ниже t_0 ускорение переноса электронов характеризуется энергией активации $E_a^{(1)} \sim 60$ кДж·моль⁻¹. При температурах выше t_0 стимулирующий эффект температуры незначителен ($E_a^{(2)} \leq 3$ кДж·моль⁻¹). Две ветви температурной зависимости параметра $\tau_{1/2}$ отражают суперпозицию двух эффектов: (1) ускорения окисления PQH₂ с ростом температуры и (2) уменьшения концентрации PQH₂ (донор электронов) при температурах выше t_0 вследствие ослабле-

ния активности Φ C2 (рис. 2, δ). Поток электронов к P_{700}^+ ослабевает с уменьшением концентрации PQH₂. При температурах выше 25–30 °C концентрация PQH₂ снижается и замедляется приток электронов к P_{700}^+ , что проявляется как уменьшение кажущейся энергии активации.

Другая причина снижения E_a в диапазоне температур, лежащих выше 25 °С, может быть связана с термоиндуцированными структурными изменениями в тилакоидах. Мембранные липиды – среда для латеральной диффузии молекул PQH₂. Липиды, расположенные внутри цитохромного $b_6 f$ -комплекса, способствуют проникновению PQH₂ в хинон-связывающий портал [11, 42]. «Затвердевание» мембранных липидов, вызванное снижением температуры ($\leq 20-25$ °С), будет препятствовать проникновению молекулы PQH₂ в хинон-связывающий портал, тем самым замедляя окисление пластохинола. Наоборот, «разжижение» мембранных липидов с повышением температуры должно ус-



Рис. 4. Окислительно-восстановительные превращения PQ и P_{700} . *a* – Показывает схему опыта по измерению характерных времен образования и окисления PQH₂. δ – Спектры ЭПР хлоропластов в темноте и при действии дальнего красного света (λ_{707}); *в* – кинетика изменений величины сигнала ЭПР от окисленных центров P_{700}^+ в ответ на вспышку белого света ($\tau_{1/2} = 750$ мс), подаваемую на фоне дальнего красного света (λ_{707}). *г* – Показаны температурные зависимости кинетических параметров $\Delta \tau$ (длительность лаг-фазы) и $\tau_{1/2}$ (время полувосстановления P_{700}^+). Графики построены на основе данных, представленных ранее [24]

корять окисление PQH_2 , поскольку увеличение подвижности PQH_2 в мембране будет способствовать образованию субстрат-ферментного комплекса ($PQH_2-b_6 f$) и тем самым ускорять окисление PQH_2 . После перехода большей части мембранных липидов в жидкокристаллическое состояние, стимулирующее влияние температуры на скорость переноса электронов, будет маскироваться снижением концентрации PQH_2 вследствие подавления активности $\PhiC2$. С феноменологической точки зрения, это проявляется как снижение активационного барьера реакции восстановления P_{700}^+ .

Рассмотрим механизмы, определяющие скорость окисления PQH_2 внутри $b_6 f$ -комплекса. Окисление PQH₂ сопровождается выделением протонов в люмен. Согласно модели окисления хинола (пластохинола в $b_6 f$ -комплексе или убихинола в bc_1 -комплексе), предложенной в опубликованных ранее исследованиях [33, 68, 69], перенос электрона на окисленный железо-серный белок (ISP_{ox}) сопряжен с депротонированием PQH_2 . При этом электрон и протон переносятся согласованно («концертно») на (Fe-S)₂кластер и на гистидиновый остаток, координированный с (Fe-S)₂-кластером [34, 35, 70-72]. Вследствие того, что окисление PQH₂ сопряжено с диссоциацией ионов Н⁺, можно предположить, что облегчение переноса протонов в люмен с ростом температуры должно способствовать ускорению окисления PQH₂. После перехода большей части липидов в «жидкокристаллическое» состояние эффект термоиндуцированного ускорения окисления РОН₂ будет выражен слабее. Последнее будет проявляться как уменьшение энергии активации реакции окисления РОН₂, проявляющееся в уменьшении наклона температурной зависимости параметра $\tau_{1/2}^{-1}$ при температурах выше 25 °С (рис. 2, *г*).

Фактором, контролирующим скорость окисления PQH₂, могли бы служить конформационные перестройки ISP [73, 74]. После восстановления ISP его подвижный домен, содержащий $(Fe-S)_2$ -кластер, смещается к гему *f* и передает ему электрон. После окисления ISP мобильный домен возвращается в исходное положение. Увеличение подвижности этого домена должно сокращать время оборота $b_6 f$ -комплекса. Однако структурные и кинетические данные свидетельствуют, что при комнатных температурах подвижность мобильного домена ISP не является стадией, лимитирующей скорость переноса электрона внутри $b_6 f$ -комплекса. Значительные смещения редокс-центра ISP происходят быстро по сравнению со скоростью окисления PQH₂. При комнатных температурах перенос электрона от ISP_{red} к цитохрому f протекает с характерным временем $\approx 2-4$ мс [75, 76]), которое короче времени окисления PQH₂ ($\tau_{1/2} \ge 5-20$ мс [13, 23, 24, 67]). Это означает, что скорость окисления PQH₂ определяется стадией переноса электрона от PQH₂ к окисленному редокс-центру ((Fe-S)₂-кластер) после образования субстрат-ферментного комплекса PQH₂–ISP_{ох}.

Синтез АТР, сопряженный с потоком электронов. При изучении закономерностей работы фотосинтетического аппарата хлоропластов использование метода ЭПР дает несомненное преимущество, связанное с тем, что наряду с измерениями редокс-превращений P_{700} в тех же самых экспериментальных условиях методом ЭПР можно изучать структурные перестройки в тилакоидных мембранах [64, 77]. Для этого обычно используют парамагнитные молекулярные зонды («спиновые зонды»), которые служат индикаторами, сигнализирующими о происходящих в мембранах структурных перестройках. Ниже мы рассмотрим пример того, как с помощью липидорастворимых спиновых зондов можно следить за термоиндуцированными структурными перестройками в липидных областях тилакоидных мембран.

Рассмотрим температурные зависимости скорости фотофосфорилирования (синтез ATP) в хлоропластах бобов класса Б. Температурные зависимости скорости образования АТР (V_{ATP}) имеют колоколообразный вид (рис. 5, а). Это объясняется суперпозицией двух эффектов, вызванных увеличением температуры: 1) ускорением переноса электронов и ростом ДрН, с одной стороны, и 2) уменьшением потока электронов и усилением пассивной утечки протонов через мембрану в обход АТР-синтазы, с другой стороны. Поэтому с ростом температуры синтез АТР сначала ускоряется, а затем спадает. Температура, при которой наблюдается максимальное значение $V_{\rm ATP}$, варьирует для хлоропластов, выделенных из листьев растений, выращенных в разных условиях [64]. Следует отметить закономерность, имеющую общий характер: с повышением температуры, при которой растут растения, температура максимума зависимости $V_{\rm ATP}(t)$ увеличивается, с понижением температуры – снижается. «Физиологический смысл» такой закономерности очевиден. Фотосинтетический аппарат растений адаптируется к условиям выращивания, «приспосабливаясь» к температуре окружающей среды. При этом, как было показано ранее [64, 78], существует четкая корреляция между температурными зависимостями параметров, характеризующих функциональные свойства хлоропластов (электронный транспорт, синтез АТР) и структурные особенности тилакоидных мембран.

Корреляция между температурными зависимостями «функциональных» и «структурных» показателей тилакоидов четко прослеживается при сравнении температурных зависимостей скорости синтеза АТР (V_{ATP}) и параметров спектров ЭПР липидорастворимых спиновых зондов, встроенных в тилакоидные мембраны (рис. 5). Спектры ЭПР спиновых зондов, локализованных в мембране (рис. 5, δ), отражают подвижность и упорядоченность в расположении их парамагнитных фрагментов (нитроксильных радикалов) относительно мембранных липидов [77, 79, 80]. На рис. 5, ε показан спектр ЭПР спин-меченой стеариновой кислоты (5-SASL), к которой ковалентно прикреплен нитроксильный радикал. С ростом температуры, по мере «разрыхления» липидных доменов мембраны, происходит разупорядочивание спиновых зондов и ускоряется их вращение, что проявляется в изменении формы спектров ЭПР. Из рис. 5, в видно, что параметр $2T'_{II}$, равный расстоянию между внешними экстремумами спектра ЭПР, уменьшается с ростом температуры. Это свидетельствует об увеличении подвижности молекул спинового зонда и понижении степени упорядоченности молекул липидов, ко-



Рис. 5. Структурно-функциональные корреляции в тилакоидных мембранах. a – Температурные зависимости скорости образования АТР ($V_{\text{АТР}}$) в двух различных препаратах хлоропластов бобов класса Б, функционирующих в условиях псевдоциклического транспорта электронов, и сравнение их с температурными зависимостями «структурного» параметра $2T'_{11}$ (по материалам работы Тихонова с соавт. [64]). Значения $2T'_{11}$ определяли из спектра ЭПР спинового зонда 5-SASL, встроенного в тилакоидную мембрану. δ – Показаны структуры MGDG, DGDG и 5-SASL. e – Спектр ЭПР спинового зонда 5-SASL, встроенного в мембрану, измеренный при комнатной температуре (22–24 °C)

торые окружают зонд [79]. Отметим, что температурные зависимости параметра $2T'_{II}$, полученные для разных препаратов хлоропластов (рис. 5, *a*, левая и правая панели), имеют «изломы» при тех же температурах, при которых скорость синтеза АТР максимальна, при 25 и 30 °C соответственно. Наличие характерного «излома» на графике температурной зависимости параметра $2T'_{II}$ является отражением структурного перехода в мембране, обусловленного ее «плавлением» — переходом большей части липидов из упорядоченного в разупорядоченное состояние [79].

Конкретное значение температуры t_0 , при которой скорость синтеза АТР максимальна, зависит от условий выращивания растений [64, 78]. Такая вариабельность может быть вызвана изменениями в составе мембранных липидов, например изменениями соотношения между ненасыщенными и насыщенными жирными кислотами [10, 39–41]. Важно подчеркнуть, что при этом сохраняется корреляция между температурными зависимостями «структурного» параметра $2T'_{II}$ и скорости синтеза АТР. Тот факт, что температуры, при которых скорости синтеза АТР максимальны, совпадают с температурами точек перегиба на графиках «структурного» параметра $2T'_{II}$ (рис. 5, *a*), можно рассматривать как свидетельство в пользу роли физического состояния («текучести») тилакоидной мембраны в регуляции фотосинтетических процессов в хлоропластах. Можно предположить, что установление определенного баланса между липидами с насыщенными и ненасыщенными углеводородными цепями обеспечивает поддержание оптимальных условий для эффективной работы фотосинтетического аппарата при данной температуре.

В литературе имеются данные, свидетельствующие о том, что состав мембранных липидов может влиять на эффективность сопряжения электронного транспорта и синтеза АТР в хлоропластах. В качестве меры эффективности энергетического сопряжения в биоэнергетике обычно используется отношение Р/2е, показывающее, сколько молекул АТР образуется в расчете на два электрона, перенесенных по цепи электронного переноса [31]. Отношение Р/2е, как известно [81], варьирует в зависимости от условий получения хлоропластов. В хлоропластах бобов это отношение увеличивается с ростом температуры, достигая значения Р/2е в диапазоне 0,8-1,2 при 22-25 °С (в зависимости от условий эксперимента) и остается постоянным при более высоких температурах [65]. Компьютерное моделирование температурных зависимостей процессов электронного и протонного транспорта в хлоропластах, выполненное в рамках развитой нами модели [82, 83], позволило адекватно описать рассмотренные выше процессы и оценить вклад различных факторов в температурную регуляцию фотосинтеза [84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Фотосинтетический транспорт электронов в хлоропластах регулируется на двух участках цепи электронного транспорта: между ФС2 и ФС1 [16, 17, 45, 46] и на стадии оттока электронов от ФС1 в цикл Кальвина–Бенсона [5, 85, 86]. В настоящем обзоре мы рассмотрели процессы температурно-зависимой регуляции электрон-транспортных процессов на участке ЦЭТ между двумя фотосистемами. Основное внимание было уделено анализу функционирования пластохинонового участка между ФС2 и цитохромным $b_6 f$ -комплексом, поскольку окисление РОН₂ является лимитирующей стадией переноса электронов в ЦЭТ между ФС2 и ФС1. Скорость этого процесса определяется временем окисления PQH₂ в пластохинол-связывающем центре (Q_0) $b_6 f$ -комплекса, ориентированном в сторону люмена. Близкое расположение $\Phi C2$ и $b_6 f$ -комплексов в тилакоидах гран и достаточно высокая подвижность пластохинона в тилакоидной мембране способствуют образованию комплекса «субстрат-фермент» $(PQH_2 - b_6 f)$, ускоряя перенос электронов между Φ С2 и *b*₆*f*-комплексом.

Результаты исследований термоиндуцированных структурных переходов в тилакоидных мембранах методом спиновых зондов согласуются с представлением о том, что адаптация фотосинтетического аппарата высших растений к температуре окружающей среды может происходить за счет изменения физико-химических свойств липидных доменов тилакоидных мембран. Соответствие температурных зависимостей функциональным и структурным характеристикам тилакоидных мембран ранее было показано методом ЭПР для различных препаратов хлоропластов бобов [64]. Изменения микровязкости липидных областей тилакоидных мембран могут происходить за счет изменения соотношения между липидами с ненасыщенными и насыщенными углеводородными цепями [40, 41]. Сосуществование «жидкой» и «кристаллической» фаз в фотосинтетических мембранах [87] может обеспечивать оптимальные условия для функционирования фотосинтетического аппарата, когда высокая скорость электронного транспорта сочетается со способностью тилакоидной мембраны поддерживать необходимый уровень ДрН.

С повышением температуры могут ускоряться диффузия пластохинона и образование субстрат-ферментного комплекса PQH_2-b_6f , возрастать ∆рН и скорость синтеза ATP. Однако при значительном повышении температуры усиливается пассивная утечка протонов из люмена в строму в обход АТР-синтазы, что вызывает падение ΔpH и уменьшение скорости синтеза ATP. По нашим наблюдениям, изменения внешних условий (например, сезонные изменения температуры) вызывают однотипные смещения точек перегиба на графиках функциональных параметров хлоропластов (скорость восстановления P_{700}^+ , синтез ATP) и параметров спектров ЭПР спиновых зондов, встроенных в тилакоидные мембраны [64]. Это может быть обусловлено варьированием соотношения липидов с насыщенными и ненасыщенными углеводородными цепями, влияющим на физико-химические свойства тилакоидных мембран. Такие изменения могут обеспечивать устойчивое функционирование фотосинтетического аппарата при колебаниях температуры окружающей среды.

Благодарности. Мы посвящаем нашу работу светлой памяти Александра Александровича Константинова, совместно с которым одному из авторов (А.Н.Т.) посчастливилось заниматься изучением электронного транспорта в дыхательной цепи митохондрий, используя метод ЭПР.

Авторы признательны Э.К. Рууге, А.А. Тимошину и Г.Б. Хомутову, совместно с которыми были получены данные, на которые мы ссылаемся в настоящем обзоре. Авторы благодарны анонимному рецензенту за полезные комментарии и замечания.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00214).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nelson, N., and Yocum, C. F. (2006) Structure and function of photosystems I and II, *Annu. Rev. Plant Biol.*, 57, 521-565.
- Mamedov, M., Govindjee, G., Nadtochenko, V., and Semenov, A. (2015) Primary electron transfer processes in photosynthetic reaction centers from oxygenic organisms, *Photosynth. Res.*, **125**, 51-63.
- 3. Boyer, P. D. (1997) The ATP synthase a splendid molecular machine, *Annu. Rev. Biochem.*, **66**, 717-749.
- 4. Walker, J. E. (2013) The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown, *Biochem. Soc. Trans.*, **41**, 1-16.
- 5. Edwards, G., and Walker, D. (1983) C₃, C₄: Mechanisms, and Cellular and Environmental Regulation, of Photosynthesis, Univ. of California Press, Berkeley.
- Staehelin, L. A. (2003) Chloroplast structure: from chlorophyll granules to supra-molecular architecture of thylakoid membranes, *Photosynth. Res.*, 76, 185-196.
- Dekker, J. P., and Boekema, E. J. (2005) Supermolecular organization of the thylakoid membrane proteins in green plants, *Biochim. Biophys. Acta*, **1706**, 12-39.
- 8. Anderson, J. M. (1982) Distribution of the cytochromes of spinach chloroplasts between the appressed membranes of grana stacks and stroma-exposed thylakoid regions, *FEBS Lett.*, **138**, 62-66.
- 9. Boudiere, L., Michaud, M., Petroutsos, D., Rébeillé, F., Falconet, D., et al. (2014) Glycerolipids in photosynthesis: composition, synthesis and trafficking, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 470-480.
- He, M., and Ding, N.-Z. (2020) Plant unsaturated fatty acids: multiple roles in stress response, *Front. Plant Sci.*, 11, 562785, doi: 10.3389/fpls.2020.562785.
- Cramer, W. A, and Hasan, S. S. (2016) Structure-function of the cytochrome b₆*f* lipoprotein complex, in *Cytochrome*

БИОХИМИЯ том 86 вып. 1 2021

Complexes: Evolution, Structures, Energy Transduction, and Signaling (Cramer, W. A, and Kallas, T., eds.), Springer Link, pp. 177-207.

- 12. Witt, H. T. (1979) Energy conversion in the functional membrane of photosynthesis. Analysis by light pulse and electric pulse methods, *Biochim. Biophys. Acta*, **505**, 355-427.
- Haehnel, W. (1984) Photosynthetic electron transport in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, 35, 659-693.
- Kirchhoff, H., Horstmann, S., and Weis, E. (2000) Control of the photosynthetic electron transport by PQ diffusion microdomains in thylakoids of higher plants, *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 148-168.
- Cardona, T., Sedoud, A., Cox, N., and Rutherford, A. W. (2012) Charge separation in photosystem II: a comparative and evolutionary overview, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 26-43.
- 16. Tikhonov, A. N. (2013) pH-Dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **116**, 511-534.
- 17. Tikhonov, A. N. (2014) The cytochrome $b_6 f$ complex at the crossroad of photosynthetic electron transport pathways, *Plant. Physiol. Biochem.*, **81**, 163-183.
- Brettel, K. (1997) Electron transfer and arrangement of the redox cofactors in photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, 1318, 322-373.
- 19. Fromme, P., Jordan, P., and Krauss, N. (2001) Structure of photosystem I, *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 5-31.
- 20. DeVault, D. (1980) Quantum mechanical tunnelling in biological systems, *Q. Rev. Biophys.*, **13**, 387-564.
- Page, C. C, Moser, C. C., Chen, X., and Dutton, P. L. (1999) Natural engineering principles of electron tunnelling in biological oxidation-reduction, *Nature*, **402**, 47-52.

- 22. Kirchhoff, H., Hall, C., Wood, M., Herbstová, M., Tsabari, O., et al. (2011) Dynamic control of protein diffusion within the granal thylakoid lumen, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 20248-20253.
- 23. Haehnel, W. (1976) The reduction kinetics of chlorophyll a_1 as an indicator of for proton uptake between the light reactions in chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, **440**, 506-521.
- Tikhonov, A. N., Khomutov, G. B., and Ruuge, E. K. (1984) Electron transport control in chloroplasts. Effects of magnesium ions on the electron flow between two photosystems, *Photobiochem. Photobiophys.*, 8, 261-269.
- Zouni, A., Witt, H.T., Kern, J., Fromme, P., Krauss, N., Saenger, W., and Orth, P. (2001) Crystal structure of photosystem II from *Synechococcus elongatus* at 3.8 Å resolution, *Nature*, 409, 739-743.
- Allakhverdiev, S. I. (2011) Recent progress in the studies of structure and function of photosystem II, *J. Photochem. Photobiol. B*, **104**, 1-8.
- Müh, F., Glöckner, C., Hellmich, J., and Zouni, A. (2012) Light-induced quinone reduction in photosystem II, *Biochim. Biophys. Acta*, 1817, 44-65.
- 28. Mitchell, P. (1976) Possible molecular mechanisms of the protonmotive function of cytochrome systems, *J. Theor. Biol.*, **62**, 327-367.
- Cramer, W. A., Hasan, S. S., and Yamashita, E. (2011) The Q cycle of cytochrome *bc* complexes: a structure perspective, *Biochim. Biophys. Acta*, 1807, 788-802.
- Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome b₆f complex: biophysical aspects of its functioning in chloroplasts, *Subcell. Biochem.*, 87, 287-328, doi: 10.1007/978-981-10-7757-9_10.
- Ivanov, B. (1993) Stoichiometry of proton uptake by thylakoids during electron transport in chloroplasts, in: *Photosynthesis: Photoreactions to Plant Productivity* (Abrol, Y. P., Mohanty, P., Govindjee, G., eds.) Springer, Dordrecht, pp. 108-128.
- 32. Hong, S. J., Ugulava, N., Guergova-Kuras, M., and Crofts, A. R. (1999) The energy landscape for ubihydroquinone oxidation at the Q_0 -site of the bc_1 complex in *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Biol. Chem.*, **274**, 33931-33944.
- 33. Crofts, A. R, Guergova-Kuras, M., Kuras, R., Ugulava, N., Li, J., and Hong, S. (2000) Proton-coupled electron transfer at the Q_0 -site: what type of mechanism can account for the high activation barrier? *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 456-466.
- 34. Crofts, A. R. (2004) Proton-coupled electron transfer at the Q_0 -site of the bc_1 complex controls the rate of ubihydroquinone oxidation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 77-92.
- 35. Crofts, A. R., Hong, S., Wilson, C., Burton, R., Victoria, D., et al. (2013) The mechanism of ubihydroquinone oxidation at the Q_0 -site of the cytochrome bc_1 complex, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1362-1377.
- Ustynyuk, L. Yu., and Tikhonov, A. N. (2018) The cytochrome b₆ f complex: DFT modeling of the first step of plastoquinol oxidation by the iron-sulfur protein, *J. Organomet. Chem.*, **867**, 290-299.
- 37. Wada, H., and Murata, N. (2009) *Lipids in Photosynthesis: Essential and Regulatory Functions*, Springer, Dordrecht.
- Zhou, Y., vom Dorp, K., Dörman, P., and Hölzl, G. (2016) Chloroplast lipids, in *Chloroplasts. Current Research and Future Trends*, Caister Academic Press, pp. 1-24.

- Los, D. A., and Murata, N. (2004) Membrane fluidity and its role in the perception of environmental signals, *Biochim. Biophys. Acta*, 1666, 142–157.
- Los, D. A., Mironov, K. S., and Allakhverdiev, S. I. (2013) Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions, *Photosynth. Res.*, **116**, 489-509.
- Maksimov, E. G., Mironov, K. S., Trofimova, M. S., Nechaeva, N. L., Todorenko, D. A., et al. (2017) Membrane fluidity controls redox-regulated cold stress responses in cyanobacteria, *Photosynth. Res.*, 133, 215-223.
- 42. Hasan, S. S., and Cramer, W. A. (2014) Internal lipid architecture of the hetero-oligomeric cytochrome $b_6 f$ complex, *Structure*, **22**, 1-8.
- 43. Hope, A. B. (2000) Electron transfers amongst cytochrome *f*, plastocyanin and photosystem I: kinetics and mechanisms, *Biochim. Biophys. Acta*, **1456**, 5-26.
- 44. Santabarbara, S., Redding, K. E., and Rappaport, F. (2009) Temperature dependence of the reduction of P_{700}^+ by tightly bound plastocyanin *in vivo*, *Biochemistry*, **48**, 10457-10466.
- 45. Kramer, D. M., Sacksteder, C. A., and Cruz, J. A. (1999) How acidic is the lumen? *Photosynth. Res.*, **60**, 151-163.
- 46. Foyer, C. H., Neukermans, J., Queval, G., Noctor, G., and Harbinson, J. (2012) Photosynthetic control of electron transport and the regulation of gene expression, *J. Exp. Bot.*, **63**, 1637-1661.
- 47. Tikhonov, A. N., Khomutov, G. B., Ruuge, E. K., and Blumenfeld, L. A. (1981) Electron transport control in chloroplasts. Effects of photosynthetic control monitored by the intrathylakoid pH, *Biochem. Biophys. Acta*, **637**, 321-333.
- 48. Li, Z., Wakao, S., Fischer, B. B., and Niyogi, K. K. (2009) Sensing and responding to excess light, *Annu. Rev. Plant Biol.*, **60**, 239-260.
- 49. Demmig-Adams, B., Cohu, C. M., Muller, O., and Adams, W. W., 3rd (2012) Modulation of photosynthetic energy conversion efficiency in nature: from seconds to seasons, *Photosynth. Res.*, **113**, 75-88.
- 50. Horton, P. (2012) Optimization of light harvesting and photoprotection: molecular mechanisms and physiological consequences, *Phil. Trans. R. Soc. B*, **367**, 3455-3465.
- 51. Chance, B., and Williams, G. R. (1956) The respiratory chain and oxidative phosphorylation, *Adv. Enzymol.*, **17**, 65-134.
- 52. Berry, J., and Björkman, O. (1980) Photosynthetic response and adaptation to temperature in higher plants, *Annu. Rev. Plant Physiol.*, **31**, 491-543.
- 53. Hu, S., Ding, Y., and Zhu, C. (2020) Sensitivity and responses of chloroplasts to heat stress in plants, *Front. Plant Sci.*, **11**, 375-385, doi: 10.3389/fpls.2020.00375.
- Quinn, P. J., and Williams, W. P. (1978) Plant lipids and their role in membrane function, *Progr. Biophys. Mol. Biol.*, 34, 107-173.
- 55. Wallis, J. G., and Browse, J. (2002) Mutants of *Arabidopsis* reveal many roles for membrane lipids, *Prog. Lipid Res.*, **41**, 254-278.
- Margolis, L. B., Tikhonov, A. N., and Vasilieva, E. Yu. (1980) Platelet adhesion to fluid and solid phospholipid membranes, *Cell*, 19, 189-194.
- 57. Ford, R. C., and Barber, J. (1983) Incorporation of sterol into chloroplast thylakoid membranes and its effect on fluidity and function, *Planta*, **158**, 35-41.

- Sawada, S., and Miyachi, S. (1974) Effects of growth temperature on photosynthetic carbon metabolism in green plants. I. Photosynthetic activities of various plants acclimatized to varied temperatures, *Plant Cell Physiol.*, 15, 111-120.
- 59. Murata, N., and Fork, D. C. (1977) Temperature dependence of the light-induced spectral shift of carotenoids in *Cvanidium caldarium* and higher plant leaves. Evidence for an effect of the physical phase of chloroplast membrane lipids on the permeability of the membranes to ions, *Biochim. Biophys. Acta*, **461**, 365-378.
- Nolan, W. G. (1980) Effect of temperature on electron transport activities of isolated chloroplasts, *Plant Physiol.*, 66, 234-237.
- Nolan, W. G. (1981) Effect of temperature on proton efflux from isolated chloroplast thylakoids, *Plant Physiol.*, 67, 1259-1263.
- 62. Тихонов А. Н., Хомутов Г. Б., Рууге Э. К. (1980) Исследование электронного транспорта в фотосинтетических системах. IX. Температурная зависимость кинетики окислительно-восстановительных превращений Р₇₀₀ при освещении хлоропластов вспышками света различной длительности, Молек. биология, 14, 157-171.
- 63. Хомутов Г. Б., Тихонов А. Н., Рууге Э. К. (1981) Исследование электронного транспорта в фотосинтетических системах. XI. Эффекты фотосинтетического контроля: влияние энергизации тилакоидной мембраны на скорость электронного транспорта в хлоропластах бобов, Молек. биология, 15, 182-198.
- 64. Тихонов А. Н., Тимошин А. А., Блюменфельд Л. А. (1983) Кинетика электронного транспорта, перенос протонов и фотофосфорилирование в хлоропластах и их связь термоиндуцированными структурными перестройками тилакоидной мембраны, *Молек. биология*, 17, 1236-1248.
- 65. Тимошин А. А., Тихонов А. Н., Блюменфельд Л. А. (1984) Термоиндуцированный структурный переход АТФ-синтетазы – фактор, регулирующий энергетическое сопряжение в хлоропластах, Биофизика, 29, 338-349.
- 66. Tikhonov, A. N., and Vershubskii, A. V. (2017) Connectivity between electron transport complexes and modulation of photosystem II activity in chloroplasts, *Photosynth. Res.*, **133**, 103-114.
- 67. Stiehl, H. H., and Witt, H. T. (1969) Quantitative treatment of the function of plastoquinone in photosynthesis, *Z. Naturforsch. B*, **24**, 1588-1598.
- 68. Brandt, U. (1996) Bifurcated ubihydroquinone oxidation in the cytochrome bc_1 complex by proton-gated charge transfer, *FEBS Lett.*, **387**, 1-6.
- 69. Link, T. A. (1997) The role of the "Rieske" iron sulfur protein in the hydroquinone oxidation (Q_p) site of the cytochrome bc_1 complex: the "proton-gated affinity change" mechanism, *FEBS Lett.*, **412**, 257-264.
- 70. Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.-L., and Picot, D. (2003) An atypical heam in the cytochrome $b_6 f$ complex, *Nature*, **426**, 413-418.
- 71. Kurisu, G., Zhang, H., Smith, J. L., and Cramer, W. A. (2003) Structure of the cytochrome $b_6 f$ complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity, *Science*, **302**, 1009-1014.
- 72. Zu, Y., Manon, M-J., Couture, M. M.-J., Kolling, D. R. J., Crofts, A. R., et al. (2003) Reduction potentials of

Rieske clusters: importance of the coupling between oxidation state and histidine protonation state, *Biochemistry*, **42**, 12400-12408.

- Zhang, Z., Huang, L., Shulmeister, V. M., Chi, Y. I., Kim, K. K., et al. (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc₁, *Nature*, **392**, 677-684.
- Hasan, S. S., Stofleth, J. T., Yamashita, E., and Cramer, W. A. (2013) Lipid-induced conformational changes within the cytochrome b₆ f complex of oxygenic photosynthesis, *Biochemistry*, **52**, 2649-2654.
- 75. Gong, X.-S., Chung, S., and Fernandez-Velasco, J. G. (2001) Electron transfer and stability of the cytochrome $b_6 f$ complex in a small domain deletion mutant of cytochrome *f*, *J. Biol. Chem.*, **276**, 24365-24371.
- 76. Yan, J., and Cramer, W. A. (2003) Functional insensitivity of the cytochrome $b_6 f$ complex to structure changes in the hinge region of the Rieske iron–sulfur protein, *J. Biol. Chem.*, **278**, 20926–20933.
- Tikhonov, A. N., and Subczynski, W. K. (2005) Application of spin labels to membrane bioenergetics (photosynthetic systems of higher plants), in *Biological Magnetic Resonance* (Eaton, S. S., Eaton, G. R., and Berliner, L. J., eds.) Kluwer Academic/Plenum Publishers, New York, pp. 147-194.
- Кукушкин А. К., Тихонов А. Н. (1988) Лекции по биофизике фотосинтеза высших растений, Изд-во МГУ, Москва.
- Griffith, O. H., and Jost, P. C. (1976) Lipid spin labels in biological membranes, in *Spin Labeling: Theory and Applications*, Academic Press, New York-London, pp. 456-524.
- Ligeza, A., Tikhonov, A. N., Hyde, J. S., and Subczynski, W. K. (1998) Oxygen permeability of thylakoid membranes: electron paramagnetic resonance spin labeling study, *Biochim. Biophys. Acta*, 1365, 453-463.
- Heise, K.-P., and Harnischfeger, G. (1978) Correlation between photosynthesis and plant lipid composition, *Z. Naturforsch.*, 33, 537-546.
- Tikhonov, A. N., and Vershubskii, A. V. (2014) Computer modeling of electron and proton transport in chloroplasts, *BioSystems*, 121, 1-21.
- Vershubskii, A. V., Trubitsin, B. V., Priklonskii, V. I., and Tikhonov, A. N. (2017) Lateral heterogeneity of the proton potential along the thylakoid membranes of chloroplasts, *Biochim. Biophys. Acta*, 1859, 388-401.
- 84. Tikhonov, A. N., and Vershubskii, A. V. (2020) Temperature-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts *in vitro* and *in silico*, *Photosynth*. *Res.*, **146**, 299-329.
- Рыжиков С. Б., Тихонов А. Н. (1988) Регуляция скорости переноса электрона в фотосинтетических мембранах высших растений, *Биофизика*, **33**, 642-646.
- Tikhonov, A. N. (2015) Induction events and short-term regulation of electron transport in chloroplasts: an overview, *Photosynth. Res.*, 125, 65-94.
- 87. Schneider, A. R., and Geissler, P. L. (2013) Coexistance of fluid and crystalline phases of proteins in photosynthetic membranes, *Biophys. J.*, **105**, 1161-1170.
- Jordan, P., Fromme, P., Witt, H. T., Klukas, O., Saenger, W., and Krauss, N. (2001) Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution, *Nature*, **411**, 909-917.

ВЕРШУБСКИЙ, ТИХОНОВ

STRUCTURAL AND FUNCTIONAL ASPECTS OF ELECTRONIC TRANSPORT THERMOREGULATION AND ATP SYNTHESIS IN CHLOROPLASTS

Review

A. V. Vershubskii, and A. N. Tikhonov*

Faculty of Physics, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: an_tikhonov@mail.ru

The review is focused on analysis of the mechanisms of temperature-dependent regulation of electron transport and ATP synthesis in chloroplasts of higher plants. Importance of photosynthesis thermoregulation is determined by the fact that plants are ectothermic organisms, whose own temperature depends on the ambient temperature. The review discusses the effects of temperature on the following processes in thylakoid membranes: (i) photosystem 2 activity and plastoquinone reduction; (ii) electron transfer from plastoquinol (via the cytochrome $b_6 f$ complex and plastocyanin) to photosystem 1; (iii) transmembrane proton transfer; and (iv) ATP synthesis. The data on the relationship between the functional properties of chloroplasts (photosynthetic transfer of electrons and protons, functioning of ATP synthese) and structural characteristics of membrane lipids (fluidity) obtained by electron paramagnetic resonance studies are presented.

Keywords: photosynthesis, chloroplasts, electron transport, thylakoid membranes, temperature-dependent regulation

УДК 576.311; 571.27

ЭЛЕКТРОМЕТРИЧЕСКОЕ ИЗУЧЕНИЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ ПЕРЕХОДА F→O ЦИТОХРОМ *с*-ОКСИДАЗЫ. ВЛИЯНИЕ ИОНОВ Zn²⁺ НА ПОЛОЖИТЕЛЬНОЙ СТОРОНЕ МЕМБРАНЫ

© 2021 С.А. Силецкий¹*, Р.Б. Геннис²

¹ НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: siletsky@belozersky.msu.ru ² Университет Иллинойса, факультет биохимии, Урбана-Шампэйн, 61801 Иллинойс, США

> Поступила в редакцию 05.10.2020 После доработки 12.12.2020 Принята к публикации 12.12.2020

Влияние ионов Zn^{2+} на P-сторону протеолипосом, содержащих встроенную в мембрану цитохром *c*-оксидазу из *Rhodobacter sphaeroides*, было изучено с помощью метода электрометрии с временным разрешением при введении одного электрона в фермент, переведенный предварительно в состояние F. Вместе с ферментом дикого типа также были изучены две его мутантные формы: N139D и D132N. Все полученные данные свидетельствуют о том, что первичное влияние Zn^{2+} , добавленного на P-сторону мембраны, заключается в ингибировании скорости высвобождения перекачиваемого протона из сайта загрузки протонов (PLS) в объемную водную фазу на P-стороне мембраны. Эти результаты позволяют определенно говорить о том, что есть два пути, по которым перекачиваемый протон может покинуть белок из PLS, а также то, что есть два отдельных сайта связывания ионов Zn^{2+} . Представлена модель, объясняющая влияние Zn^{2+} на кинетику образования мембранного потенциала COX дикого типа, а также её мутантных форм N139D и D132N.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: цитохром *с*-оксидаза, ионы цинка, протеолипосомы, электрогенный, протонный насос, цитохром *aa*₃, *Rhodobacter sphaeroides*.

DOI: 10.31857/S0320972521010103

введение

Цитохром *с*-оксидаза (СОХ) является редокс-зависимым протонным насосом, который трансформирует энергию высоко экзергонического процесса восстановления молекулярного кислорода до молекулы воды в генерацию трансмембранной разности электрохимических потенциалов протонов, обозначаемую $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ [1–3]. Этот фермент имеет четыре редокс-центра, содержащих металлы. Два входных центра (Си_А и гем *а*) переносят электроны от природного донора (цитохром *c*) на конечный каталитический сайт, где кислород восстанавливается до воды. Сайт восстановления кислорода распо-

* Адресат для корреспонденции.

ложен глубоко в гидрофобном ядре белка и образуется при участии высокоспинового иона железа гема a_3 и иона меди, Cu_B .

Механизм генерации $\Delta \tilde{\mu}_{H^+}$ цитохром *с*-оксидазой включает электрогенный перенос электронов и «химических» протонов в биядерный центр гем a_3 /Си_в с противоположных сторон мембраны, приводя в итоге к образованию воды из молекулярного кислорода. Кроме поглощения химических протонов, один протон дополнительно перекачивается через мембрану на каждый электрон, перенесенный цитохром *с*оксидазой от цитохрома *с* на молекулярный кислород [4].

С помощью метода рентгеновской кристаллографии были получены трехмерные кристаллические структуры четырех представителей семейства А цитохром *с*-оксидаз [5–7], в которых были выявлены 3 предполагаемых протон-проводящих пути (К-, D- и H-каналы) для переноса протонов из внутренней водной фазы в ходе каталитического цикла. Работы с бактериальными оксидазами в значительной степени были облегчены возможностью получения мутантных форм фермента с нарушенной активностью [8–11].

Принятые сокращения: BNC – биядерный центр; COX – цитохром *с*-оксидаза (cytochrome *c* oxidase); $\Delta \Psi$ – изменение трансмембранного потенциала; F, O и P – состояния цитохром *с*-оксидазы (states of cytochrome *c* oxidase); P- и N-фазы –положительно и отрицательно заряженные водные фазы, разделенные сопрягающей мембраной; PLS – сайт загрузки протонов (proton loading site); Rubpy – Tris-бипиридиновый комплекс рутения (Trisbipyridyl complex of ruthenium (II)); WT – COX дикого типа.

Каталитический цикл СОХ можно описать в виде четырех одноэлектронных переносов от цитохрома c на биядерный центр, приводящих к восстановлению O_2 до H_2O . Каждый из этих четырех одноэлектронных этапов сопряжен с перекачкой одного протона через мембрану. Каталитический цикл начинается с окисленной формы фермента (состояние O). Последовательное добавление электронов в присутствии молекулярного кислорода приводит к образованию серии промежуточных состояний фермента, обозначаемых как состояния E, R, P_M и F:

$$O \rightarrow E \rightarrow R \rightarrow P_M \rightarrow F \rightarrow O.$$

После восстановления фермента двумя электронами с образованием восстановленного одним электроном (состояния Е) и двумя электронами (состояния R) происходит связывание молекулы О₂ и затем расщепление связи О-О с образованием состояния Рм, в котором один атом кислорода связан с феррильной (Fe⁴⁺) формой гема a_3 , а второй атом кислорода связан с Си_в в виде гидроксильной группы (ОН⁻). Для расщепления связи О-О необходимы 4 электрона. Два необходимых дополнительных электрона обеспечиваются ионом Fe^{3+} гема a_3 , переходящим в гипервалентное состояние Fe⁴⁺, и редокс-активным модифицированным остатком тирозина в активном центре [12]. Переносы электронов при переходах $P_M \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$, по существу, приводят к восстановлению двух электронов, «заимствованных» для расщепления связи О-О. Можно предварительно перевести СОХ в состояния P_M и F и затем изучать переходы P_м→F и F→O в виде изолированных одноэлектронных переходов с использованием Trisбипиридинового комплекса рутения (Rubpy) как фотоактивируемого одноэлектронного восстановителя [13].

За изменениями трансмембранного потенциала, $\Delta \Psi$, в результате фотоинъекции одного электрона в состояния P_M и F, можно наблюдать с использованием электрометрических методов. Такие эксперименты привели к выявлению нескольких фаз с временным разрешением процесса генерации напряжения при переходах P_M→F и F→O в случае COX из клеток млекопитающих (из сердца быка), а также COX *aa*₃ из бактериальных источников, таких как Paracoccus den*itrificans* и *Rhodobacter sphaeroides* [2, 13–14]. Эти фазы включают быстрые (микросекундные) компоненты, которые не чувствительны к присутствию KCN, блокирующему реакции с участием кислорода в биядерном центре гем a_3/Cu_B (BNC), и следующие за ними более медленные (миллисекундные) компоненты, которые не обнаруживаются в присутствии КСN. Ион цианида (CN⁻) связывается с BNC.

На многие вопросы, касающиеся механизма действия СОХ, до сих пор нет ответов. В настоящей работе нами было использовано преимущество, которое дает ингибирование активности СОХ при добавлении Zn²⁺ на электрически положительную сторону мембраны, и мониторинг перехода F→O с использованием электрометрических методов. Ингибиторы часто являются полезными инструментами для изучения механизма действия ферментов. Большинство ингибиторов COX направлены на BNC (активный центр фермента) или входные сайты протон-проводящих каналов на N-стороне мембраны. Есть несколько ингибиторов, которые оказывают воздействие на Р-сторону мембраны. Кроме Zn²⁺, изученного в настоящей работе, заякоренные на мембране пептиды, возможно, также могут ингибировать фермент с Р-стороны мембраны [15].

Помимо того, что Zn²⁺ является полезным лабораторным инструментом, высокие концентрации Zn²⁺ вызывают гибель нервных клеток [16]. Также было показано присутствие Zn²⁺ в межмембранном пространстве митохондрий [17]. Когда цитозоль клетки перегружен Zn²⁺, его можно изолировать в межмембранном пространстве митохондрий [17] - месте, которое крайне важно для реакций окислительного фосфорилирования. Свободные радикалы, образующиеся в виде токсичных побочных продуктов, могут способствовать высвобождению Zn²⁺ из металлотионеина, приводя к повышению концентрации свободных ионов Zn²⁺ в межмембранном пространстве по сравнению с цитозолем [17]. Высокие концентрации Zn²⁺ ингибируют образование энергии в клетке. Мишенью действия Zn²⁺ в гликолизе является глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа [18], а в цикле трикарбоновых кислот ионы Zn²⁺ нацелены на α-кетоглутаратдегидрогеназу [19]. В дыхательной цепи Zn²⁺ оказывает воздействие на основные генераторы протондвижущей силы путем ингибирования восстановления и протонирования хинона и/или транслокации протонов в митохондриальных комплексах I и III [20-21], ингибирует активность NADH-дегидрогеназы в клетках Escherichia coli [22], митохондриальной СОХ и бактериальных цитохромоксидаз аа₃и сbb₃-типа [23-25].

Влияние Zn²⁺ на активность COX было исследовано в нескольких лабораториях. Aagaard и Brzezinski [26] изучили влияние Zn²⁺ на солюбилизированную детергентами COX aa_3 из *R. sphaeroides* с помощью метода «флоу-флэш». Было показано, что Zn²⁺ ингибирует как переход $P_R \rightarrow F$, так и переход $F \rightarrow O$ в ходе одного оборота фермента после добавления O_2 к полностью восстановленному ферменту. Было предположено, что сайты связывания Zn^{2+} располагаются на входе в протонный D-канал на N-стороне COX, и это затем было подтверждено структурными данными [27].

Также было проведено изучение COX, включенной в протеолипосомы, содержащие Zn^{2+} на внутренней (N-стороне) мембраны [28]. Присутствие Zn^{2+} на N-стороне COX приводило к снижению стехиометрии перекачивания протона (на электрон) и замедлению скоростей стадий переноса зарядов, относимых к переносу протонов через D- и K-каналы. В этих работах было проведено изучение влияния Zn^{2+} в условиях стационарных измерений оборотов фермента и во время перехода $F \rightarrow O$ с временным разрешением. В целом, результаты, полученные Ааgaard и Brzezinski [26], соответствуют результатам Kannt et al. [28].

Влияние Zn²⁺, добавленного на Р-сторону СОХ, было впервые изучено на митохондриях [29] и затем на COX из R. sphaeroides, включенных в протеолипосомы [23]. В обоих случаях стационарная активность СОХ ингибировалась Zn²⁺, добавленным к внешней стороне мембраны (Р-сторона), и только при наличии трансмембранной $\Delta \Psi$. Было показано, что в присутствии разобщителей, которые разрушают протондвижущую силу, Zn²⁺, добавленный с Р-стороны, не вызывает ингибирование фермента. Однако было обнаружено, что добавление Zn²⁺ на Рсторону бычьей СОХ, реконструированной в протеолипосомах в присутствии разобщителей, приводит к значительному ингибированию, но при этом фермент должен совершать обороты в присутствии восстановителя, и ингибирование ионами Zn²⁺ при этом может происходить в течение многих минут или часов [24]. Было предположено, что данное ингибирование может быть связано с замедлением скорость-лимитирующего перехода F→O каталитического цикла, и для него не требуется трансмембранной $\Delta \Psi$. Предположительно, сайт связывания Zn²⁺ на P-стороне не доступен в окисленном состоянии фермента, но становится доступным для катиона в некоторых частично восстановленных состояниях оксидазы. Было предположено, что это может быть связано с восстановлением Cu_в [30].

С использованием метода флоу-флэш [31] было показано, что Zn^{2+} , добавленный к P-стороне COX из *R. sphaeroides*, реконструированной в липосомах, не вызывает изменений скоростей внутренних реакций переноса электронов, но при этом он избирательно нарушает процесс

высвобождения протона только во время перехода P_в→F и не оказывает действия при переходе F→O. Однако условия метода флоу-флэш не воспроизводят условия присутствия слабого восстановителя или влияние $\Delta \Psi$, которые наиболее тесно связаны с естественными условиями внутри митохондрий. В настоящей работе с использованием фотовведения одного электрона с помощью Rubpy в COX из R. sphaeroides, peконструированной в протеолипосомах, было проведено детальное изучение того, как связывание Zn²⁺ с Р-стороной СОХ изменяет электрогенные стадии во время перехода F→O. В отличие от работ с использованием метода флоуфлэш [31], полученные нами результаты показывают, что связывание Zn²⁺ с Р-стороной СОХ приводит к ингибированию высвобождения протонов во время перехода F→O.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение фермента. СОХ aa_3 была выделена из мембран клеток *R. sphaeroides*, как было описано ранее [32].

Включение СОХ в состав протеолипосом. Везикулы, содержащие COX (COVs), получали с помощью стандартного метода диализа холата, который ранее был использован при работе с СОХ быка [33], цитохром ba3-оксидазой из Thermus thermophilus [34] и аа₃-оксидазой из R. sphaeroides [9]. Очищенный препарат азолектина в концентрации 40 мг/мл суспендировали в 75 мМ HEPES-КОН, pH 7,4, содержащем 2% холата, раствор озвучивали до достижения его прозрачности. Солюбилизированную цитохромоксидазу инкубировали во льду в 75 мМ HEPES-КОН, рН 7,4, содержащем 2% холата, в течение 1 ч, затем смешивали с озвученным азолектином с конечной концентрацией 4 мкМ оксидазы и 40 мг/мл липида.

Спектрофотометрические измерения с временным разрешением при проведении экспериментов по фотовосстановлению. Фотоиндуцированные разрешенные во времени изменения величины оптического поглощения измеряли с помощью однолучевого спектрофотометра с микросекундным временным разрешением. Подробности таких измерений были ранее опубликованы [9, 35-39]. Реакция запускалась вспышкой, направленной от лазера («Spectra Physics», США) с удвоенной частотой (frequency-doubled neodymium YAG laser; Lab-170-10; $\lambda = 532$ нм; 9 нс; 200-300 мДж). Образец помещали в прямоугольную полумикрокювету с длиной оптического пути 4 мм («Starna Cells», США). Сигнал фотоумножителя был оцифрован с помощью карты PC-installed Gage 8012A card («GaGe», США) (временная шкала – 2 000 000 точек с запрограммированным распределением; шкала по оси ординат – 12 бит). 15–30 кривых, снятых через каждые 3–5 с, были усреднены для каждой кривой поглощения.

Регистрация образования электрического потенциала с временным разрешением. Генерация разности электрических потенциалов на мембране везикул регистрировалась методом электрометрии [40], адаптированным для проведения экспериментов с СОХ с временным разрешением [41–42]. Подробности приготовления образцов и использованного метода были приведены в предыдущих статьях [9, 33, 43–44].

Анализ полученных данных. Экспериментальные кинетические кривые были обработаны с помощью программ Origin 7 («OriginLab Corporation», CIIIA), PLUK [45], MATLAB («Mathworks», США). Характеристические значения времен и относительные величины (амплитуды) электрогенных стадий были получены разложением электрометрических кривых на индивидуальные экспоненты, как это было сделано ранее при изучении фотоэлектрических ответов цитохромоксидазы и других электрогенных белков [33-34, 46-49]. Если электрогенные фазы обладают близкими значениями констант скорости и ассоциированы с последовательными, а не с параллельными процессами, то истинные амплитуды фаз могут сильно различаться в зависимости от того, какая кинетическая модель была использована [50]. Исходя из этого, относительные величины промежуточных и медленных электрогенных протонных фаз были пересчитаны, согласно последовательной модели [13, 51].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние Zn²⁺ на индуцированную светом быструю кинетику образования мембранного потенциала цитохром с-оксидазой дикого типа из R. sphaeroides (WT). На рис. 1 представлен индуцированный светом электрогенный ответ с временным разрешением, полученный в результате измерения событий переноса заряда, сопряженных с переходом F→O цитохром *с*-оксидазы из R. sphaeroides. Перед введением электрона COX была переведена в состояние F путем обработки перекисью водорода встроенного в липосому окисленного фермента, как это было описано ранее [52]. В результате были разделены во времени четыре основных электрогенных процесса, что соответствовало предыдущим результатам [11]: две быстрые фазы в микросекундной временной шкале (примерно 10 и 31 мкс), промежуточная фаза (~0,49 мс) и медленная фаза (~1,53 мс). Их относительные амплитуды представлены в табл. 1 и хорошо согласуются с предыдущими измерениями [9, 11]. Микросекундные компоненты этого ответа нечувствительны к действию КСN. Первая быстрая фаза ассоциирована с переносом электрона от Cu_A на гем *a*; минорная, 2-я быстрая фаза, связана с переносом положительного заряда или протона (изнутри наружу), добавляя электрогенность стадии переноса электрона.

Более медленные миллисекундные фазы (~0,4 и ~1,5 мс) фотоэлектрического ответа чувствительны к КСN и находятся в зависимости от функционального состояния D-канала входа протонов [8]. Эти фазы регистрируют движение как перекачиваемых, так и химических протонов через фермент.

На рис. 1 наглядно показано, что добавление Zn^{2+} в раствор (Р-сторона COX) приводит к замедлению миллисекундных составляющих фотоэлектрического ответа, но не влияет на его микросекундную составляющую. Качественно сходные результаты были получены ранее при изучении COX из митохондрий быка [24]. Эффект добавления Zn^{2+} носит обратимый характер, что было показано в экспериментах с добавлением ЭДТА (рис. 1, *a*), где обеспечивается изоляция Zn^{2+} из раствора и восстанавливается фотоэлектрический ответ до такой степени, которая наблюдается в отсутствие Zn^{2+} .

На рис. 1, б показано, что если вместо Zn²⁺ добавить Ni²⁺, то изменений в фотоэлектрическом ответе не наблюдается. Это согласуется с сообщениями Mills et al. [23] о том, что ингибирование двухвалентными металлами, добавляемыми на Р-сторону, специфично для ионов Zn^{2+} , что контрастирует с ингибированием, когда двухвалентные металлы добавляются на Nсторону СОХ. Ni²⁺, Cd²⁺ и другие ионы оказывают такой же ингибирующий эффект, как и Zn²⁺. Следовательно, эти данные определенно говорят о том, что ингибирующее действие Zn^{2+} , о котором говорится в настоящей работе, не связано с его проникновением через липосомную мембрану и связыванием с D-протонным каналом с N-стороны.

В табл. 1 и на рис. 2 представлен мультиэкспоненциальный анализ электрогенного ответа в присутствии ионов цинка. Полученные экспериментальные данные были проанализированы с использованием 5-экспоненциальной (рис. 2, *a*) и 4-экспоненциальной аппроксимации (рис. 2, *б*). Графики остаточных величин в каждом случае показывают, что использование пяти экспонент оправдано для анализа кинетических кривых.



Рис. 1. Влияние добавления Zn^{2+} на кинетику образования мембранного потенциала цитохром *c*-оксидазой из *R. sphaeroides. a* – СОХ дикого типа после добавления Zn^{2+} и после добавления EDTA. *b* – Те же условия, что в панели (*a*), но при этом вместо Zn^{2+} был добавлен Ni²⁺. Для сравнения, также показана кинетика из рис. 1, *a*, полученная после добавления Zn^{2+} , и она нормализована относительно полного значения. Условия: 5 мМ Tris-ацетат, pH 8,0, 10 мМ анилин, 40 мкМ Rubpy, 4 мМ H₂O₂ (40 мкМ Zn²⁺, 100 мкМ Ni²⁺ и 0,2 мМ ЭДТА были добавлены, если указано)

Константы времени и относительные амплитуды фаз представлены в табл. 1, в которой также есть результаты, полученные ранее [8, 9, 11] для кинетики генерации потенциала в отсутствии Zn^{2+} . В отсутствии Zn^{2+} данные хорошо описываются 4-экспоненциальной аппроксимацией. Полученные результаты говорят о том, что присутствие Zn^{2+} приводит к дополнительной медленной миллисекундной фазе, которая не наблюдается в отсутствие ингибитора.

Как показано в табл. 1, основное влияние 40 мкМ Zn^{2+} и 320 мкМ Zn^{2+} оказывается на медленную фазу, которая разбивается на два компонента, «медленная-1» и «медленная-2».

Таблица 1. Кинетические фазы, наблюдаемые с использованием электрометрических методов, после фотоинъекции электрона для запуска перехода $F \rightarrow O$ в реконструированной в протеолипосомах COX дикого типа (WT) из *R. sphaeroides* при отсутствии Zn²⁺, в присутствии 40 мкM Zn²⁺ и в присутствии 320 мкM Zn²⁺

WT			WT + 40 мкМ Zn ²⁺			WT + 320 мкМ Zn ²⁺		
Фаза	τ, мс	Амплитуда, %	Фаза	τ, мс	Амплитуда, %	Фаза	τ, мс	Амплитуда, %
1-я быстрая	0,01	18	1-я быстрая	0,011	19	1-я быстрая	0,01	18
2-я быстрая	0,031	12,5	2-я быстрая	0,03	11	2-я быстрая	0,049	16
промежуточная	0,49	22	промежуточная	0,94	16	промежуточная	0,84	18
медленная	1,53	46,5	1-я медленная	4,7	35	1-я медленная	5,9	11
			2-я медленная	18,9	19	2-я медленная	21,9	39



Рис. 2. Кинетика образования мембранного потенциала при переходе $F \rightarrow O COX$ из *R. sphaeroides* COX в присутствии Zn^{2+} . *а* – Полученные данные были проанализированы с помощью 5-экспоненциальной аппроксимации. δ – Данные были проанализированы с использованием 4-экспоненциальной аппроксимации. Графики остаточных значений свидетельствуют, что в присутствии Zn^{2+} «медленная» миллисекундная фаза кинетики подразделяется на две фазы (подробности см. в тексте статьи и табл. 1). Условия показаны на рис. 1



Рис. 3. *а* — Кинетика образования мембранного потенциала во время перехода COX из *R. sphaeroides* из состояния F в состояние O при различных концентрациях Zn^{2+} , добавленного к протеолипосомам. δ — Зависимость величины 1-й и 2-й медленных протонных фаз от концентрации Zn^{2+} . Условия приведены на рис. 1

Сумма величин двух медленных составляющих, наблюдаемая в присутствии Zn^{2+} (табл. 1), соответствует величине медленного компонента, наблюдаемого в отсутствии Zn^{2+} . Постоянные времени 1-й и 2-й медленных фаз значительно длиннее, чем у медленной фазы, наблюдаемой при отсутствии Zn^{2+} . Следует отметить, что повышение концентрации Zn^{2+} с 40 до 320 мкМ не

изменяет константы времени для 1-й и 2-й медленных фаз, но изменяет их амплитуды (обсуждается в следующем разделе). Изменение константы времени наиболее медленного компонента, наблюдаемого в присутствии и при отсутствии Zn^{2+} , согласуется со снижением стационарного количества оборотов, которое было отмечено при добавлении Zn^{2+} [23–24].

Таблица 2. Зарегистрированная спектроскопически кинетика реокисления гема *а* в COX дикого типа (WT) из *R. sphaeroides* COX в присутствии или при отсутствии 120 мкM Zn^{2+}

	WI		WT + 120 мкМ Zn ²⁺		
Фаза	τ, мс	Величина, %	τ, мс	Величина, %	
1	0,4	33	0,61	42	
2	1,6	55	6,2	48	
3	9	12	30,9	10	

Концентрационная зависимость влияния Zn²⁺ на кинетику образования мембранного потенциала. На рис. 3, а показаны фотоэлектрические ответы СОХ в присутствии различных концентраций Zn²⁺ (вплоть до 320 мкМ). Кривые были нормализованы с использованием амплитуды микросекундной части (1-я быстрая + 2-я быстрая фазы) кинетических кривых, которая не изменяется при добавлении Zn²⁺. Мультиэкспоненциальный анализ (рис. 2) показывает, что повышение концентрации Zn²⁺ от 40 до 320 мкМ изменяет амплитуду 1-й и 2-й медленных фаз без заметного изменения временных констант (табл. 1). На рис. 3, б представлена зависимость амплитуд 1-й и 2-й медленных фаз от концентрации Zn^{2+} . Очевидно, что по мере повышения концентрации Zn^{2+} амплитуда 1-й медленной фазы уменьшается, в то время как амплитуда 2-й медленной фазы становится доминирующей.

Влияние Zn²⁺ на кинетику перехода F \rightarrow O, регистрируемую на основе изменений оптического поглощения гема. Кинетика событий, происходящих после индуцированного светом ввода электрона от Rubpy в COX, предварительно переведенную в F-состояние, также регистрировалась по изменениям величины оптического поглощения гемовых центров. Увеличение значения поглощения при 444 нм (не разрешенный по времени скачок вверх на кривых, рис. 4, *a*) вызвано восстановлением гема *a* в результате переноса электрона от Cu_A. Последующее снижение величины поглощения при 444 нм связано с переносом электрона от гема *a* в гем-медный биядерный центр, приводящее к восстановлению оксиферрильной формы гема a_3 (Fe⁴⁺=O²⁻) с образованием окисленного состояния гема a_3 (состояние O).

В кинетике реокисления гема а в отсутствии Zn^{2+} (рис. 4, *a*, «контроль») разрешены две фазы с т ~0,4 и 1,6 мс (см. табл. 2), совпадающие по времени с промежуточной и медленной электрогенными протонными фазами. Небольшая третья фаза (~(5-15)% от общей величины) с τ ~10 мс (см. табл. 2) ассоциирована с реокислением гема а в небольшой популяции молекул фермента, которые не способны осуществлять ферментативную реакцию [11]. В присутствии 120 мкМ Zn^{2+} реокисление гема *a* существенно замедляется (рис. 4, а) и хорошо описывается двумя экспоненциальными фазами с т ~0,6 и ~6,2 мс (табл. 2), которые соответствуют промежуточной фазе и медленной фазе 1, наблюдаемым в электрометрических измерениях. Также обнаруживается третья минорная фаза (~10% от общей величины) с т ~30 мс, ассоциированная с небольшой популяцией молекул фермента, которые не способны осуществлять ферментативную реакцию. Наиболее заметным является отсутствие компонента оптических данных, который соответствует медленной фазе 2 в присутствии Zn^{2+} (рис. 4, б). Медленная электрогенная фаза 2 является оптически «молчашей».

Влияние ионов Zn^{2+} на P-стороне мембраны на кинетику образования мембранного потенциала в мутантных формах COX (N139D и D132N) на входе протон-проводящего D-канала. Аминокислотная замена N139D в COX из *R. sphaeroides*, локализованная немного выше входа в протон-проводящий D-канал, устраняет перекачивание протонов через мембрану, но не влияет на способность COX восстанавливать кислород [9]. Как ранее было показано, электрометрические измерения перехода $F \rightarrow O$ мутантной формы COX N139D свидетельствуют об отсутствии ки-

Таблица 3. Кинетические фазы, наблюдаемые при использовании электрометрических методов после фотоинъекции электрона, приводящего к переходу $F \rightarrow O$ в реконструированной в протеолипосомах мутантной форме N139D COX из *R. sphaeroides* в отсутствие Zn²⁺ и в присутствии 100 мкM Zn²⁺

N139D				N139D + 100 мкМ Zn ²⁺			
	Фаза	τ, мс	Величина, %		Фаза	τ, мс	Величина, %
1	1-я быстрая	0,0094	35	1	1-я быстрая	0,014	32
2	2-я быстрая	0,058	30	2	2-я быстрая	0,071	29
3	медленная	0,85	35	3	медленная	0,62	39



Рис. 4. Влияние Zn^{2+} на кинетику изменений оптического поглощения гемов *R. sphaeroides* COX во время перехода F \rightarrow O после введения электрона в фермент в состоянии F. *a* – Кинетика изменения значений поглощения при 444 нм в отсутствии Zn^{2+} и после добавления Zn^{2+} (черные сплошные линии – это измеренные кривые, красные сплошные линии – обработанные данные). Также показана (синяя пунктирная линия) кинетика такого же перехода F \rightarrow O, зарегистрированная с помощью электрометрии на основе измерения скорости образования мембранного потенциала. *б* – Обработка экспериментальных данных с помощью двуэкспоненциальной модели кинетики перехода F \rightarrow O, регистрируемой по изменению величины оптического поглощения при 444 нм в присутствии Zn^{2+} , также внизу показан график остаточных значений. Условия: конечный образец содержал COX (~20 мкМ) в 5 мМ Tris-ацетатном буфере и 0,05–0,1% додецилмальтозида, 40 мкМ Rubpy, 10 мМ анилина и 2 мМ H₂O₂. Две кривые оптического поглощения на панели (*a*) показаны после их нормализации относительно величины фотовосстановления гема *a*

нетической фазы, соответствующей переносу протонов из водной фазы с N-стороны в сайт загрузки протонов (PLS), но при этом сохраняются как быстрые фазы (1-я и 2-я), так и фаза (с $\tau \sim 0.6$ мс), соответствующая переносу протонов из водной фазы с N-стороны мембраны в BNC (рис. 5). Электрогенная фаза, соответствующая переносу протонов из водной фазы

с N-стороны в PLS, отсутствует в случае этого не перекачивающего мутанта. Добавление Zn^{2+} не оказывало заметного влияния на электрогенную фазу, наблюдаемую в отсутствии Zn^{2+} (рис. 5, табл. 3). На вставке в рис. 5 показано, что нет эффектов на пассивную разрядку мембранного потенциала в присутствии Zn^{2+} в течение секунд.

Аминокислотная замена D132N во входном участке D-канала, в отличие от замены N139D, вызывает значительное подавление способности фермента восстанавливать кислород, также как и способности перекачивать протоны. На рис. 6 представлена кинетика образования мембранного потенциала мутантной формой D132N в отсутствии Zn^{2+} и в присутствии Zn^{2+} как после 5, так и после 10 мин инкубации перед проведением измерений. На рис. 6, *а* показаны экспериментальные кривые, нормализованые по максимальной амплитуде, в то время как на рис. 6, *б* кривые были нормализованы с использованием амплитуд быстрых фаз. Быст-

рый микросекундный электрогенный ответ мутантной формы D132N сходен с ответом фермента WT (табл. 4). Наиболее заметный эффект аминокислотной замены D132N заключается в низкой величине амплитуд протонных фаз (~0,73 и ~3,7 мс) (табл. 4) [8]. Поскольку замена D132N эффективно блокирует вход в канал, это замедление протонных миллисекундных фаз должно быть связано с движением внутренних протонов внутри D-канала. Снижение со временем величины микросекундной части кинетики (рис. 6, а), вероятно, является следствием увеличения степени восстановленности гема а перед вспышкой из-за сниженной стационарной активности мутантной формы D132N, которая еще более снижается в присутствии Zn²⁺.

Основной эффект добавления Zn^{2+} на P-сторону мутанта D132N проявляется в появлении очень медленной фазы (147 мс, табл. 4). Для стационарной активности мутантной формы



Рис. 5. Влияние Zn^{2+} , добавленного к P-стороне мутантной формы N139D COX из *R. sphaeroides*, на кинетику образования мембранного потенциала во время перехода F \rightarrow O. Во вставке показаны те же данные, отложенные против более крупной временной шкалы. Условия описаны на рис. 1



Рис. 6. Влияние Zn^{2+} на кинетику образования мембранного потенциала мутантной формой D132N. *a* – Кривые были нормализованы с использованием общей величины. δ – Кривые были нормализованы с использованием амплитуды быстрых фаз (в точке ~0,1 мс). Условия описаны на рис. 1. Показано время инкубации

D132N характерен «обратный» дыхательный контроль, что указывает на то, что значительная часть протонов, поступивших в BNC, приходят с Р-стороны, а не с N-стороны, как в случае СОХ WT. Однако в одноэлектронных измерениях в режиме одного оборота фермента не наблюдается отрицательный электрометрический эффект. Его отсутствие возможно по двум причинам. 1) В отсутствие Zn²⁺ протон в мутантной форме D132N переносится в BNC как с Р-стороны через PLS в части фермента, так и из внутреннего источника внутри D-канала, но в немного большей части фермента. Это согласуется с низкой электрометрической амплитудой миллисекундной фазы, а также с положительным знаком, указывающим на суммарный положительный заряд, движущийся изнутри наружу. Это не могло бы происходить постоянно в случае множественных оборотов фермента, которые основываются на потоке протонов с Р-стороны мембраны, так как вход в D-канал на Nстороне в результате аминокислотной замены D132N блокирован. 2) В качестве альтернативы перенос протона с Р-стороны в BNC может быть очень медленным (сотни миллисекунд) и не может быть разрешен из-за слияния с пассивной разрядкой мембраны ($\tau \sim 0.5$ с).

Если связывание Zn²⁺ вызывает блокировку доступа с Р-стороны в биядерный центр, для протонов единственным путем достижения BNC является путь с N-стороны мембраны через D-канал. Однако в связи с заменой D132N доставка протонов через D-канал с N-стороны сильно заингибирована, что приводит к заметной, но очень медленной электрогенной фазе, наблюдаемой в присутствии Zn²⁺.

Таблица 4. Кинетические фазы, наблюдаемые с помощью электрометрических методов, после фотоинъекции одного электрона для инициации перехода $F \rightarrow O$ в мутантной форме D132N COX из *R. sphaeroides* в отсутствии Zn^{2+} и в присутствии 100 мкМ Zn^{2+}

D132N				D132N + 100 мкМ Zn ²⁺ , 5 минут инкубации			
Фаза		τ, мс	Амплитуда, %	Фаза		τ, мс	Амплитуда, %
1	1-я быстрая	0,01	58	1	1-я быстрая	0,011	26
2	2-я быстрая	0,035	18	2	2-я быстрая	0,030	19
3	промежуточная	0,734	17	3	промежуточная	0,53	16
4	медленная	3,7	7	4	медленная	147	39

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Результаты, представленные в настоящей работе, подтверждают, что Zn^{2+} связывается с Рстороной СОХ, и это вызывает ингибирование фермента. Эффекты ингибирования фермента с Р-стороны ионами Zn^{2+} можно резюмировать в следующем виде.

1. Основное воздействие на фермент дикого типа заключается в разделении медленной электрогенной фазы на два компонента: 1-ю и 2-ю медленные фазы. Обе фазы замедлены по сравнению с медленной фазой в отсутствии Zn^{2+} . Повышение концентрации Zn^{2+} от 20 до 320 мкМ не вызывает изменений констант времени 1-й и 2-й медленных фаз. Сумма величин 1-й и 2-й медленных фаз остается постоянной, поскольку при повышении концентрации Zn²⁺ происходит увеличение амплитуды 2-й медленной фазы, и в то же время величина 1-й медленной фазы уменьшается. Вторая медленная фаза не связана с переносом электронов от гема а на BNC, в то время как промежуточная и 1-я медленная фаза сопровождаются окислением гема а.

2. Zn²⁺ не оказывает влияния на электрогенные фазы, наблюдаемые в несопряженной мутантной форме N139D.

3. Связывание Zn²⁺ с Р-стороной мутантной формы D132N приводит к появлению очень медленной фазы.

Электрогенные эффекты в ферменте WT. Чтобы обсудить влияние Zn^{2+} , сначала необходимо обсудить кинетику перехода F \rightarrow O в отсутствии Zn^{2+} . Подробности в табл. 5 и на рис. 7.

После лазерной вспышки Си_А восстанавливается под действием Rubpy в течение 1 мкс. Микросекундная нечувствительная к действию КСN электрогенная часть кинетики перехода $F \rightarrow O$ в COX из *R. sphaeroides* состоит из двух компонентов [11]. Первая быстрая фаза (стадия 1 на рис. 7) относится к переносу электрона от Си₄ на гем *а*. Происхождение второй быстрой фазы неизвестно. Среди её возможных источников [11]: а) перенос протона от E286 на PLS, обозначенный как стадия 2 на рис. 7; б) перемещение протона внутри каналов D или K; в) высвобождение протона из кластера [-ОН- Mg^{2+} -(E254)- H_3O^+] в объемную водную фазу на Р-стороне, запускаемое переносом электрона от Си_А на гем а. Вариант (в) может быть исключен отсутствием влияния Zn²⁺ на 2-ю быструю фазу. Мы предполагаем, что 2-я быстрая фаза соответствует переносу протона от E286 на PLS (стадия 2 на рис. 7).

За быстрыми фазами следуют две КСNчувствительные электрогенные компоненты (0,5 и 1,5 мс), которые связаны с этапами переноса электрона от гема *a* на BNC. «Промежуточная» электрогенная фаза (стадия 3 на рис. 7) связана с переносом протона из N-фазы для репротонирования E286. Медленная фаза (стадия 4 на рис. 7) соответствует выбросу перекачиваемого протона из PLS и сопряженному электрогенному поглощению из N-фазы химического протона в BNC.

Влияние Zn^{2+} можно объяснить с помощью модели, в которой эффект связывания Zn^{2+} с Рстороной СОХ обусловлен ингибированием скорости выхода протонов из PLS в объемную

	Фаза	τ	Амплитуда *	Заряды поперек мембраны**	Основные перемещения зарядов
1	1-я быстрая	10 мкс	18%	0,33	перенос электрона: CuA \rightarrow гем a
2	2-я быстрая	31 мкс	12,5%	0,23	неотнесенный перенос Н+
3	промежуточная	0,49 мс	37%	0,68	1. поглощение перекачиваемого протона в PLS; 2. перенос электрона: гем $a \rightarrow$ гем a_3 (30–35%).
4	медленная	1,53 мс	32,5%	0,6	1. поглощение химического протона в BNC; 2. высвобождение перекачиваемого протона из PLS на P сторону; 3. перенос электрона: гем $a \rightarrow$ гем a_3 (55–60%).
				$\Sigma = 1,84$	

Таблица 5. Электрогенные фазы, наблюдаемые во время перехода F→O COX дикого типа из *R. sphaeroides*

* Вклад промежуточной и медленной протонной фаз рассчитан на основе значений из табл. 1, предполагая последовательную модель двух протонных фаз [51].

** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя.



Рис. 7. Электрогенные стадии, сопряженные с переходом $F \rightarrow O$ в результате переноса одного электрона, инициированного светом, в COX из *R. sphaeroides* в отсутствии или в присутствии Zn^{2+} . Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электронов; синие стрелки – транслокация протонов. Показан разветвленный канал выхода протонов. Диаграммы, расположенные слева, в центре и справа, показывают 3 состояния фермента: без Zn^{2+} (*a*), в присутствии низких (б) или высоких (в) концентраций Zn^{2+} соответственно. На рис. 7, б и в показана не специфическая локализация Zn^{2+} -связывающих сайтов, а электрогенные стадии, на которые влияет Zn^{2+} . Ионы цинка в низкой концентрации замедляют транспорт протонов по основному протон-высвобождающему пути (4). В результате действия высокой концентрации Zn^{2+} медленный протон-высвобождающий путь (5) преобладает над основным. См. подробности в тексте

водную фазу на Р-стороне. Ингибирующее действие Zn²⁺ в отношении фермента WT явно указывает на то, что должно быть два различных сайта связывания, приводящих к ингибированию. Этот вывод основан на влиянии изменения концентрации Zn²⁺. При низких концентрациях Zn²⁺ (например, <20 мкМ) медленная фаза разбивается на 1-ю и 2-ю медленные фазы. Константы времени для промежуточной и 1-й и 2-й медленных фаз остаются неизменными при возрастании концентрации Zn^{2+} . Однако повышение концентрации Zn^{2+} вызывает изменение амплитуды 1-й и 2-й медленных фаз, и при этом сумма амплитуд этих двух фаз поддерживается на одном уровне. Поэтому мы предположили присутствие высокоаффинного сайта ($K_d < 20$ мкМ) и низкоаффинного сайта ($K_d \sim 100$ мкМ) для ионов Zn²⁺, которым характерны различные ингибиторные эффекты в отношении фермента. Сайт с высокой аффинностью, наиболее вероятно, похож на сайт, наблюдаемый при стационарных измерениях тока электронов в фермент, индуцированный слабыми восстановителями [30].

Чтобы объяснить влияние Zn²⁺, мы высказали предположение о том, что есть два пути выхода протонов, высвобождающихся из PLS, с помощью которых они могут достигнуть объемной водной фазы на Р-стороне мембраны. Это согласуется с результатами ранее опубликованной работы по молекулярному моделированию путей переноса молекул воды в объемную водную фазу на Р-стороне, которые, в принципе, могут также служить для переноса протонов [53]. В отличие от входных протон-проводящих каналов (каналы D и K) с четко определенной локализацией пути, каналы выхода протона не имеют четкой локализации. Это сеть водородных связей. Она соединяет различными путями пропионатные группы гемов а и а₃ с внешней стороной молекулы фермента [7]. Есть достаточные основания предположить, что может быть более одного пути выхода протона с различными внутренними скоростями прохода протона и с участием различных аминокислотных остатков. Использование параллельных путей движения протонов с различными внутренними скоростями не редкость для регуляции протон-проводящих путей в белках. Например, протеородопсин из Exiguobacterium sibiricum, у которого есть два пути переноса протонов на шиффово основание с различными внутренними скоростями, равными примерно 0,6 и 4 мс [47-48].

Полученные данные согласуются с двумя каналами выхода протонов в COX из *R. sphaeroides*,

которые имеют внутренние константы времени, ассоциированные с высвобождением протонов, равные 1,5 и 18,9 мс. Они показаны на рис. 7, δ и в. В отсутствии Zn²⁺ используется только один путь, для которого характерна быстрая кинетика ($\tau = 1,5$ мс). Высвобождение протона из PLS сопряжено с доставкой другого (химического) протона в BNC, и это соответствует медленной фазе в отсутствии Zn²⁺ (стадия 4, рис. 7, *a*). Связывание Zn²⁺ с высокоаффинным сайтом замедляет перенос протона из быстрого пути до 4,7 мс, и протоны, используюцие этот путь при низких концентрациях Zn²⁺, ответственны за 1-ю медленную фазу (стадия 4, рис. 7, δ).

При повышении концентрации Zn²⁺ загруженность низкоаффинного сайта связывания $(K_{\rm d} \sim 100 \text{ мкM})$ возрастает, и мы предполагаем, что связывание ${\rm Zn}^{2+}$ с этим сайтом полностью блокирует вклад 4,7 миллисекундного пути, делая скорость переноса протона через этот путь более медленной, чем через медленный протонпроводящий путь. Вследствие этого высвобождение протона может протекать только через 18,9 миллисекундный путь, соответствующий 2-й медленной фазе (стадия 5, рис. 7, в). При 40 мкМ Zn²⁺ преобладает выход протона через 4,7 миллисекундный путь (рис. 3, б), но по мере увеличения концентрации Zn²⁺ повышенная загруженность низкоаффинного сайта увеличивается и, следовательно, для высвобождения протона из PLS должен использоваться 18,9 миллисекундный путь. В этом случае преобладает 2-я медленная фаза (рис. 7, в). Поскольку передвижения заряда, ассоциированные с 1-й и 2-й медленными фазами, по существу, одинаковы, сумма их амплитуд остается постоянной при различных концентрациях Zn^{2+} .

Перенос электрона от гема *а* в BNC может происходить до доставки протона от Е286 до BNC за счет использования локально доступного протона. При отсутствии Zn²⁺ процесс переноса электрона в BNC является двухфазным, и он наблюдается во время промежуточной и медленной фаз. Доставка протона от Е286 в BNC, однако, откладывается до депротонирования PLS. В присутствии Zn²⁺ процесс переноса электрона в BNC также является двухфазным и наблюдается во время промежуточной и 1-й медленной фазы. Однако доставка протона от E286 в BNC происходит и в 1-й, и во 2-й медленных фазах, совпадая со скоростью высвобождения протона из PLS через два пути. Перенос электрона в BNC завершается до 2-й медленной фазы, которая, следовательно, оптически «бесшумна». В табл. 6 представлены части 1-й и 2-й медленных фаз в виде функции от концентрации Zn^{2+} , а также оценки количества перенесенного заряда относительно доли мембранного диэлектрика. Для подсчета перенесенного заряда были использованы две различные модели. При этом предполагалось, что промежуточная и медленные (1-я и 2-я) фазы протекают либо параллельно, либо последовательно друг за другом. При высоких концентрациях Zn²⁺ доля 1-й медленной фазы не стремится к нулю, но остается равной ~20%. Это соответствует электрогенному переносу заряда на расстояние примерно 0,19 и 0,16 мембранного диэлектрика в параллельной и последовательной моделях соответственно (табл. 6). По всей видимости, амплитуда 1-й медленной фазы при высокой концент-

Таблица 6. Зависимость 1-й и 2-й медленных фаз транслокации зарядов, сопряженных с переходом из состояния F в состояние O COX дикого типа из *R. sphaeroides*, от концентрации Zn^{2+}

[Zn ²⁺] мкМ	F1, 1-я медленная фаза*	F1, заряды через мембрану**	F1, заряды через мембрану***	F2, 2-я медленная фаза*	F2, заряды через мембрану**	F2, заряды через мембрану***
5	100%	0,94	0,75	0%	0	0
20	88%	0,83	0,66	12%	0,11	0,11
40	65%	0,61	0,49	35%	0,33	0,31
120	45%	0,42	0,34	55%	0,52	0,49
320	20%	0,19	0,16	80%	0,75	0,71

* F1 = 100% × ампл. (1-я медленная)/(ампл.(1-я медленная)+ампл. (2-я медленная)).

* F2 = 100% × ампл. (1-я медленная)/(ампл.(1-я медленная)+ампл. (2-я медленная)).

** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя. Вклад 2-й медленной протонной фазы был рассчитан на основе кажущихся значений с учетом параллельных процессов, протекающих в промежуточной, 1-й и 2-й медленных фазах. *** При проведении расчетов предполагается, что перенос электрона от Cu_A на гем *a* соответствует транслокации одного элеэлементарного заряда через 1/3 изолирующего диэлектрического слоя. Вклад протонных фаз был рассчитан на основе кажущихся значений с учетом проходящих последовательно друг за другом промежуточной и 1-й медленной фаз, а также промежуточной и 2-й медленной протонных фаз, как было описано ранее [51].

рации Zn²⁺ (~0,19 или ~0,16 от мембранного диэлектрика) включает электрогенный перенос протона от E286 в BNC (~0,06, принимая во внимание электрогенную дистанцию ~0,12 от мембранного диэлектрика [11] и вклад кинетики реокисления гема а в 1-й медленной фазе, равный ~0,48 (табл. 2)) и какой-то дополнительный электрогенный процесс. Мы связываем этот дополнительный электрогенный процесс с переносом протона от PLS к развилке двух путей выхода протонов, что определяет скорость 1-й медленной фазы. Этот процесс происходит в обеих популяциях фермента и непосредственно связан с переносом электронов в BNC. На этой точке разделения (развилке) могут находиться несколько возможных аминокислотных остатков. Например, возможно, это могут быть H411, D407 и D412, как показано на рис. 1 в статье Mills et al. [23]. Еще предстоит выяснить, как эти два пути выхода протона могут быть связаны с каналами R и T выхода воды, предсказанными с помощью метода молекулярного моделирования [53]. Чтобы выйти за рамки предположений, необходимы дальнейшие исследования с привлечением методов биоинформатики и мутагенеза.

Электрогенные эффекты в отношении мутантных форм N139D и D132N. Высвобождение протона из PLS в водную фазу с P-стороны не наблюдается в несопряженной мутантной форме COX N139D. Следовательно, связывание Zn^{2+} с P-стороной не оказывает влияния на протекание электрогенных фаз, наблюдаемых в случае этой мутантной формы. Это подтверждает вывод о том, что все эффекты Zn^{2+} могут быть отнесены к его влиянию на скорость выхода протона из PLS (рис. 8).

Блокировка D-канала в результате замены D132N достаточно сильна, чтобы при стационарном обороте протоны достигали BNC, используя в обратном направлении путь между объемной водной фазой с P-стороны и PLS. Однако в настоящей работе, в которой использовался метод фотоинициированной «инъекции» электрона в



Рис. 8. Электрогенные стадии, сопряженные с фотоинициированным переносом одного электрона и переходом $F \rightarrow O$ мутантной формы N139D COX из *R. sphaeroides* при отсутствии (*a*) и в присутствии (*б*) ионов Zn^{2+} . Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электрона; голубые и синие стрелки – транслокация протона. Стадия переноса перекачиваемого протона, связанная с «промежуточной» протонной электрогенной фазой в ферменте WT, отсутствует в случае несопряженной мутантной формы N139D [9]. Эта стадия показана пунктирной линией. Также предполагается перенос протона от E286 на PLS, но он происходит одновременно с переносом протона в обратном направлении (сплошные линии, стадия 3). Высвобождение протона из PLS в P-фазу показано в виде пунктирной линии. Отсутствие значительного эффекта ионов Zn^{2+} на медленную фазу мутантной формы N139D указывает на то, что именно перенос протонов из PLS в P-фазу ингибируется Zn^{2+} в COX дикого типа



Рис. 9. Электрогенные стадии, сопряженный с фотоиницированным переносом одного электрона при переходе $F \rightarrow O$ мутантного D132N белка COX из *R. sphaeroides* в отсутствии (*a*) и в присутствии (*б*) Zn²⁺. Электрогенные стадии обозначены стрелками: красные стрелки – перенос электронов; голубые и синие стрелки – транслокация протонов. Внутренний донор протонов в D-канале точно не известен, и он выделен кругом

режиме одного оборота фермента, обратный электрогенный ответ, который можно было ожидать, основываясь на измерениях в стационарных условиях [23], прямо не наблюдается (рис. 9).

Одним возможным объяснением для наблюдаемых электрогенных фаз является то, что в мутантной форме D132N COX перенос электрона от гема *a* в BNC индуцирует перенос протона с P-стороны в BNC у части популяции фермента (тонкая сплошная линия в фазе 4 на рис. 9, *a*). Однако в другой части фермента протон доставляется из внутреннего источника внутри D-канала с такой же скоростью, но с противоположным знаком, поскольку протоны перемещаются в противоположных направлениях (фаза 3 на рис. 9, *a*). Так как эти два процесса протекают одновременно, но с противоположными электрогенными эффектами, итоговая амплитуда очень мала.

Другим объяснением является то, что электрогенная фаза 3 (рис. 9) отражает быструю доставку протона в BNC от внутреннего донора внутри D-канала, однако этот процесс переноса протона является неполным, так как pK_a внутреннего донора либо очень высока (нет полного

депротонирования) или очень низка (исходно протонирован не полностью). Этот эффект (не очень подходящее значение pK_a , частичный перенос протонов в BNC) будет незаметен, если произойдет быстрое репротонирование этого донора из D-канала. Однако быстрый перенос протона из N-фазы запрещен мутацией (пунктирная линия фазы 4 на рис. 9, а). Популяция молекул фермента, для которых протон не был доставлен в BNC от внутреннего донора внутри D-канала, могут получить протон с Р-стороны. Однако, если перенос протона с Р-стороны происходит очень медленно (сотни миллисекунд), то это не должно обнаруживаться на фоне пассивной разрядки мембраны. В обоих случаях в присутствии Zn²⁺ транспорт протона с Р-стороны заблокирован, и наблюдается очень медленный перенос протона через D-канал (тонкая сплошная линия в фазе 4 на рис. 9, δ).

Связь с предыдущими наблюдениями о влиянии Zn^{2+} на транслокацию протонов в цитохромоксидазе. Физический механизм и вероятные сайты высвобождения протонов, ингибируемые ионами Zn^{2+} . В отличие от результатов исследований с использованием метода флоу-флэш [31], полу-

D132N

ченные нами результаты свидетельствуют о том, что связывание Zn^{2+} с COX на её P-стороне снижает скорость перехода F \rightarrow O и ингибирует высвобождение протонов во время этого перехода. При измерении методом флоу-флэш полностью восстановленный фермент реагирует с молекулярным кислородом в режиме одного оборота. Сетап данного метода не предполагает ни наличия мембранного потенциала на липосомах, ни слабого потока электронов через фермент, чье присутствие необходимо для проявления ингибирующего эффекта ионов цинка с P-стороны мембраны при субмиллимолярных концентрациях.

Эффект замедления перехода $F \rightarrow O$, который был изучен в настоящей работе в слабых восстановительных условиях (Rubpy/анилин [24, 30]), вызван действием Zn²⁺ на наиболее медленную стадию каталитического цикла, каковой является скорость-лимитирущая реакция всего цикла цитохромоксидазы. Степень замедления хорошо коррелирует с ингибированием в этих условиях активности цитохромоксидазы (85-90%) [30]. В слабо восстаналивающих условиях предполагается, что ингибирующий эффект может быть обусловлен избирательным взаимодействием ионов цинка с одним или несколькими частично восстановленными промежуточными состояниями каталитического цикла или промежуточными состояниями СОХ, возникающими в течение короткого периода во время перехода одного относительно стабильного промежуточного состояния в другое [24].

Было также предположено, что так называемый «невидимый» ион меди (Cu_в) в центре связывания кислорода в молекуле СОХ может быть тем компонентом, чье восстановление ответственно за связывание Zn²⁺ на внешней стороне восстановительных при слабых условиях [24, 30]. Восстановление Си_в связано с значительной перестройкой образованной тремя остатками гистидина координационной сферы этого редокс-центра, что может вызвать структурные изменения в белке, приводящие к увеличению активности связывающей группы по отношению к иону Zn^{2+} [54]. Следует отметить, что аминокислотный остаток Е286, основной донор протонов для PLS и BNC в «реакционном боксе» цитохромоксидазы, входит в состав петли со связанными между собой ковалентной связью остатками Y288-H284, которые, в свою очередь, взаимодействуют с гемом a_3/Cu_B (H284 является одним из лигандов Cu_в), и с помощью этого взаимодействия могут отслеживать редокс-изменения в активном центре во время восстановления кислорода [55]. С другой стороны, Zn²⁺-связывающая группа может быть функционально связана (и влиять на свойства) с сайтом загрузки протонов PLS, который участвует в высвобождении перекачиваемого протона во внешнюю водную фазу [30].

Нужно отметить, что переход из состояния F в состояние О, который разрешается при изучении с помощью метода флоу-флэш, отличается от экспериментов по инъекции электрона от Rubpy тем, что в состоянии F цитохромоксидаза уже содержит дополнительный электрон, поделенный между входными редокс-центрами (Cu_A и гем a). В то же время при проведении экспериментов по инъекции электрона от Rubpy в состояние F происходят полные последовательные окислительно-восстановительные превращения Cu_A и гема *a*. В то же время предполагается, что один из возможных путей высвобождения протона и воды сформирован вблизи Cu_{A} [55–56], что может указывать на значимость в развитии ингибиторного действия ионов цинка также и редокс-превращений Си₄.

Специфический механизм наблюдаемого замедления этапов переноса протонов ионами Zn²⁺ может иметь различную физическую природу. Поскольку скорость обмена ионов Zn^{2+} в сайте/-ах их связывания, вероятно, намного выше, чем разрешенные по времени электрогенные фазы, ионы Zn²⁺ вряд ли работают как настоящие блокаторы переноса протонов. Однако связывание ионов Zn²⁺ с аминокислотными остатками H, E или D может оказывать прямое или косвенное воздействие на пути переноса протонов. Это может быть реализовано путем связывания с а.о., которые непосредственно вовлечены в высвобождение протонов, или с остатками, которые могут электростатически увеличивать потенциальную энергию для переноса протонов через путь. Связывание а.о. из различных спиральных структур, в принципе, может препятствовать конформационным изменениям белка, сопряженным с высвобождением протонов. Помимо воздействия электростатических сил на а.о., мы также не исключаем того, что Zn²⁺ может прямо ограничивать водные цепочки, которые формируют путь выхода протонов.

На основании этой работы мы предполагаем существование, по крайней мере, двух функционально различных сайтов связывания ионов Zn^{2+} с Р-стороны мембраны и двух функционально различных путей высвобождения перекачиваемого протона. Влияние низких или высоких концентраций ионов цинка может быть результатом, например: 1) ингибирования конформационных изменений во время перекачивания в связи со связыванием Zn^{2+} с остатками близлежащих спиральных участков; 2) связывания Zn^{2+} вблизи или внутри протон-проводяще-



Рис. 10. Вероятные сайты связывания ионов цинка на P-стороне мембраны в 3D-структуре aa_3 цитохромоксидазы из *R. sphaeroides* (*a* и δ – вид сбоку и сверху соответственно). Показаны боковые цепи и металлсодержащие центры (Cu_A, Cu_B, Mg и гемы). Гемы показаны в виде зеленого проволочного каркаса. Fe, Cu и Mg – круги, раскрашенные в красный, голубой и зеленый цвет соответственно. Остатки H (His), D (Asp), E (Glu) показаны различным цветом: оливковый, марджента и сине-зеленый соответственно. Три потенциальных сайта связывания ионов Zn²⁺ на P-стороне мембраны обведены квадратами: 1) His93, His67, Glu66; 2) His104, His277, Asp271; 3) His132, His188, Asp129, Glu185. Обозначения аминокислотных остатков, используемые на рисунке: H – His; D – Asp; E – Glu. Значения координат цитохром aa_3 -оксидазы из *R. sphaeroides* взяты из архива PDB [7]. Для визуализации использовали программу PyMol

го пути и изменения барьера для переноса протона.

По нашему мнению, одним из наиболее простых и логичных объяснений является предположение, что замедление 1-й медленной фазы по сравнению с медленной фазой фермента дикого типа происходит в результате опосредованного влияния Zn²⁺ (это, возможно, ингибирование изменения конформации белка, если связывание ионов цинка происходит не в непосредственной близости к протон-проводящему пути), в то время как появление 2-й медленной фазы означает более непосредственное ингибирующее действие Zn²⁺ на выход протона через основной (осуществляемый в ферменте WT) путь и, по всей вероятности, является результатом связывания ионов цинка вблизи или внутри протон-проводящего пути. В результате высвобождение протона протекает через более медленный путь. Поскольку 1-я медленная фаза не исчезает полностью даже при высоких концентрациях ионов цинка, это говорит о том, что два режима действия Zn²⁺ не могут протекать параллельно из-за связывания Zn²⁺ в одном и том же сайте.

В качестве предварительных результатов нами были обнаружены три потенциальных сайта связывания ионов цинка на P-стороне мембраны в 3D-структуре цитохром aa_3 -оксидазы из *R. sphaeroides* (каждый из который включает по два остатка H и остатки E/D) (рис. 10). Один из них находится сильно в стороне (3); один или два других (1 и 2 на рис. 10) расположены недалеко от центров Cu_A и Mg, а также предполагаемых, исходя из молекулярно-динамического исследования митохондриальной цитохромоксидазы [53] R- и Т-выводящих воду путей, соединяющих полость иона Mg²⁺ с внешней стороной фермента. Описанные выше участки представляют собой сайты в дополнение к тем остаткам Н и карбоксильным группам, которые являются непосредственно лигандами Си_А и атома Mg, и вблизи которых может быть организован один из предполагаемых путей выделения протона [55]. Очевидно, что существуют несколько потенциальных сайтов связывания Zn²⁺, расположенных над биядерным центром и, следовательно, вблизи потенциальных путей высвобождения протонов. Необходимы дальнейшие работы, чтобы найти корреляцию между этими сайтами и двумя Zn²⁺-связывающими сайтами, обнаруженными в кристаллах митохондриальной цитохромоксидазы, обработанной миллимолярными концентрациями Zn²⁺ [57], с Zn²⁺-связывающими сайтами на N-стороне COX [58], с Zn²⁺-связывающими сайтами в комплексе bc_1 [59–60], бактериальных реакционных центрах [61] и др. Биоинформатические и молекулярно-биологические исследования этих эффектов в цитохромоксидазе необходимы и могут быть запланированы в будущем.

выводы

Ингибирование Zn²⁺ с Р-стороны мембраны было четко продемонстрировано при изучении электрогенных фаз в переходе F->O цитохромоксидазы с использованием фотоинициируемого введения электрона от Rubpy. Полученные результаты показывают, что должно быть два различных сайта связывания Zn²⁺ с различным действием на фермент. Согласно полученным результатам, определенно должны быть два пути выхода для протона, высвобождаемого из PLS, чтобы он мог перейти в водную фазу с Р-стороны мембраны, причем каждый путь обладает своей внутренней скоростью высвобождения протона. Эти данные согласуются с ранее полученными результатами молекулярного моделирования и обеспечивают экспериментальные возможности для дальнейшего изучения того, как протоны высвобождаются из PLS на P-сторону мембраны.

Финансирование. Выполнение данной работы было поддержано Российским Научным Фондом (грант № 19-14-00063).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в финансовой и какой-либо иной области.

Соблюдение этических норм. В настоящей статье нет описания работ, проведенных авторами с участием людей или использованием животных в качестве объектов исследования.

Благодарности. Авторы благодарны Илье Олейникову за техническое содействие в изго-

товлении рисунка 10. Авторы выражают благодарность анонимным рецензентам, особенно рецензенту 2 и рецензенту 3.

Примечание. Эта работа посвящена памяти профессора А.А. Константинова, выдающегося ученого, вдохновляющего коллеги, учителя и очень хорошего друга.

Работы по изучению влияния ионов цинка на активность цитохромоксидазы и образование мембранного потенциала были начаты в лаборатории А.А. Константинова в начале 2000-х годов. Влияние Zn²⁺ на митохондриальную цитохромоксидазу описано в работах А.А. Константинова и соавторов [24, 30], его вклад и достижения в этой области были высоко оценены, они мотивировали и вдохновляли нас в этой работе.

А.А. Константинов любил и науку и музыку и обогащал жизнь всех, с кем общался. Он сыграл большую роль в расшифровке механизма генерации мембранного потенциала цитохром *с* оксидазой, используя различные умные стратегии. Его мышление было ясным и критичным. Научные дискуссии с его участием были очень яркими и полезными.

Р.Б. Геннис выражает глубокую признательность и благодарность Саше за посещение его лаборатории в Урбане, штат Иллинойс (США) и дальнейшие продолжительные визиты. Он был желанным гостем у нас дома и мои дети его очень любили, у них тоже остались очень теплые воспоминания о Саше. Мы также разделяли общий интерес к фильмам и книгам. После его ухода в наших душах образовалась большая пустота, и его очень нам не хватает.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- 1. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/ copper terminal oxidases, *Chem. Rev.*, **7**, 2889-2907.
- 2. Siletsky, S. A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **18**, 36-57.
- 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.
- 4. Wikstrom, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273.
- 5. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**, 660-669.
- 6. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguichi, H., et al. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **272**, 1136-1144.
- Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The Xray crystal structures of wild-type and EQ(1-286) mutant cytochrome c oxidases from *Rhodobacter sphaeroides.*, J. Mol. Biol., **321**, 329-339.

- 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.
- Siletsky, S. A., Pawate, A. S., Weiss, K., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2004) Transmembrane charge separation during the ferryl-oxo → oxidized transition in a nonpumping mutant of cytochrome c oxidase., J. Biol. Chem., 279, 52558-52565.
- Han, D., Namslauer, A., Pawate, A. S., Morgan, J. E., Nagy, S., et al. (2006) Replacing Asn207 by aspartate at the neck of the D channel in the *aa*₃-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in decoupling the proton pump, *Biochemistry*, **45**, 14064-14074.
- Siletsky, S. A., Zhu, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2010) Partial steps of charge translocation in the nonpumping N139L mutant of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome c oxidase with a blocked D-channel, *Biochemistry*, 49, 3060-3073, doi: 10.1021/bi901719e.
- 12. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock, G. T. (2000) Oxygen

activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, **290**, 1588-1591.

- Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabio.2011. 08.003.
- 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.
- Shirey, K., Stover, K. R., Cleary, J., Hoang, N., and Hosler, J. (2016) Membrane-anchored cyclic peptides as effectors of mitochondrial oxidative phosphorylation, *Biochemistry*, 55, 2100-2111, doi: 10.1021/acs.biochem. 5b01368.
- Frederickson, C. J., and Bush, A. I. (2001) Synaptically released zinc: physiological functions and pathological effects, *Biometals*, 14, 353-366, doi: 10.1023/a:1012934207456.
- Fudge, D. H., Black, R., Son, L., LeJeune, K., and Qin, Y. (2018) Optical recording of Zn⁽²⁺⁾ dynamics in the mitochondrial matrix and intermembrane space with the GZnP2 sensor, ACS Chem. Biol., 13, 1897-1905, doi: 10.1021/acschembio.8b00319.
- Sheline, C. T., Behrens, M. M., and Choi, D. W. (2000) Zinc-induced cortical neuronal death: contribution of energy failure attributable to loss of NAD(+) and inhibition of glycolysis, *J. Neurosci.*, **20**, 3139-3146.
- Gazaryan, I. G., Krasnikov, B. F., Ashby, G. A., Thorneley, R. N., Kristal, B. S., and Brown, A. M. (2002) Zinc is a potent inhibitor of thiol oxidoreductase activity and stimulates reactive oxygen species production by lipoamide dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, 277, 10064-10072, doi: 10.1074/jbc.M108264200.
- Sharpley, M. S., and Hirst, J. (2006) The inhibition of mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase) by Zn²⁺, *J. Biol. Chem.*, **281**, 34803-34809, doi: 10.1074/jbc.M607389200.
- 21. Link, T. A., and von Jagow, G. (1995) Zinc ions inhibit the QP center of bovine heart mitochondrial *bc*1 complex by blocking a protonatable group, *J. Biol. Chem.*, **270**, 25001-25006, doi: 10.1074/jbc.270.42.25001.
- Schulte, M., Mattay, D., Kriegel, S., Hellwig, P., and Friedrich, T. (2014) Inhibition of Escherichia coli respiratory complex I by Zn⁽²⁺⁾, *Biochemistry*, 53, 6332-6339, doi: 10.1021/bi5009276.
- 23. Mills, D. A., Schmidt, B., Hiser, C., Westley, E., and Ferguson-Miller, S. (2002) Membrane potential-controlled inhibition of cytochrome *c* oxidase by zinc, *J. Biol. Chem.*, **277**, 14894-14901.
- Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2005) Zink ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 128-136.
- 25. Lee, H. J., and Adelroth, P. (2013) The heme-copper oxidase superfamily shares a Zn^{2+} -binding motif at the entrance to a proton pathway, *FEBS Lett.*, **587**, 770-774, doi: 10.1016/j.febslet.2013.01.069.
- 26. Aagaard, A., and Brzezinski, P. (2001) Zinc ions inhibit oxidation of cytochrome *c* oxidase by oxygen, *FEBS Lett.*, **494**, 157-160.
- Francia, F., Giachini, L., Boscherini, F., Venturoli, G., Capitanio, G., et al. (2007) The inhibitory binding site(s) of Zn²⁺ in cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **581**, 611-616.
- 28. Kannt, A., Östermann, T., Muller, H., and Ruitenberg, M. (2001) Zn^{2+} binding to the cytoplasmic side of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase selectively uncouples electron transfer and proton translocation, *FEBS Lett.*, **503**, 142-146.

- 29. Nicholls, P., and Singh, A. P. (1988) Effect of zinc on proteoliposomal cytochrome oxidase. *Life Sci. Adv. (Biochemistry, Delhi)*, **7**, 321-326.
- 30. Vygodina, T. V., Zakirzyanova, W., and Konstantinov, A. A. (2008) Inhibition of membrane-bound cytochrome *c* oxidase by zinc ions: High-affinity $Zn^{(2+)}$ -binding site at the P-side of the membrane, *FEBS Lett.*, **582**, 4158-4162.
- Faxen, K., Salomonson, L., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2006) Inhibition of proton pumping by zinc ions during specific reaction steps in cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 388-394.
- Mitchell, D. M., and Gennis, R. B. (1995) Rapid purification of wildtype and mutant cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* by Ni²⁺-NTA affinity chromatography, *FEBS Lett.*, **368**, 148-150.
- Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome *c* oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, 38, 4853-4861.
- Siletskiy, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., et al. (1999) Time-resolved generation of membrane potential by *ba*₃ cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear centre, *FEBS Lett.*, 457, 98-102.
- 35. Azarkina, N., Siletsky, S., Borisov, V., von Wachenfeldt, C., Hederstedt, L., and Konstantinov, A. A. (1999) A cytochrome *bb*'-type quinol oxidase in *Bacillus subtilis* strain 168, *J. Biol. Chem.*, **274**, 32810-32817.
- Siletsky, S. A., Belevich, I., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2009) Time-resolved O_H→E_H transition of the aberrant ba₃ oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 201-205.
- Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2011) Time-resolved singleturnover of *caa*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabio.2011.05.006.
- 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.
- Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., et al. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H⁺-ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321-324.
- 41. Zaslavsky, D., Kaulen, A., Šmirnova, I. A., Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389-393.
- 42. Zaslavsky, D. L., Smirnova, I. A., Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Millett, F., and Konstantinov, A. A. (1995) Rapid kinetics of membrane potential generation by cytochrome *c* oxidase with the photoactive Ru(II)-trisbipyridyl derivative of cytochrome *c* as electron donor, *FEBS Lett.*, 359, 27-30.
- Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikstrom, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2007) Time-resolved single-turnover of *ba*₃ oxidase from *Thermus thermophilus, Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383-1392, doi: 10.1016/j.bbabio.2007.09.010.
- 44. Siletsky, S. A., Belevich, I., Soulimane, T., Verkhovsky, M. I., and Wikstrom, M. (2013) The fifth electron in the

fully reduced *caa*(3) from Thermus thermophilus is competent in proton pumping, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1-9, doi: 10.1016/j.bbabio.2012.09.013.

- Kalaidzidis, Y. L., Gavrilov, A. V., Zaitsev, P. V., Korolev, E. V., and Kalaidzidis, A. L. (1997) PLUK- an environment for software development, *Progr. Comp. Soft.*, 23, 206-211.
- Mamedov, M. D., Tyunyatkina, A. A., Siletsky, S. A., and Semenov, A. Y. (2006) Voltage changes involving photosystem II quinone-iron complex turnover, *Eur. Biophys. J.*, 35, 647-654.
- Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta*, 1857, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabio.2016.08.004.
- Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., et al. (2019) Elimination of proton donor strongly affects directionality and efficiency of proton transport in ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1860**, 1-11, doi: 10.1016/j.bbabio.2018.09.365.
- Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikstrom, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by ba3 cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and OH states, *Biochim. Biophys. Acta*, 1858, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabio.2017.08.007.
- Medvedev, D. M., Medvedev, E. S., Kotelnikov, A. I., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Analysis of the kinetics of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection., *Biochim. Biophys. Acta*, 1710, 47-56.
- Siletsky, S. A., Han, D., Brand, S., Morgan, J. E., Fabian, M., et al. (2006) Single-electron photoreduction of the P_M intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1122-1132, doi: 10.1016/j.bbabio. 2006.07.003.
- Vygodina, T. V., and Konstantinov, A. A. (1988) H₂O₂induced conversion of cytochrome *c* oxidase peroxy complex to oxoferryl state, *Ann. NY Acad. Sci.*, **550**, 124-138.

- 53. Sugitani, R., and Stuchebrukhov, A. A. (2009) Molecular dynamics simulation of water in cytochrome *c* oxidase reveals two water exit pathways and the mechanism of transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1140-1150.
- Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Inoue, N., et al. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Science*, 280, 1723-1729.
- 55. Mills, D. A., and Ferguson-Miller, S. (2002) Influence of structure, pH and membrane potential on proton movement in cytochrome oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 96-100.
- 56. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Proton exit channels in bovine cytochrome *c* oxidase, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1999-2006, doi: 10.1021/jp0464371.
- 57. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., et al. (2007) A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7881-7886.
- 58. Qin, L., Mills, D. A., Hiser, C., Murphree, A. R., Garavito, M., et al. (2007) Crystallographic location and mutational analysis of Zn and Cd inhibitory sites and role of lipidic carboxylates in rescuing proton path mutants in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **46**, 6239-6248.
- Klishin, S. S., Junge, W., and Mulkidjanian, A. Y. (2002) Flash-induced turnover of the cytochrome *bc*1 complex in chromatophores of *Rhodobacter capsulatus*: binding of Zn²⁺ decelerates likewise the oxidation of cytochrome *b*, the reduction of cytochrome *c*1 and the voltage generation, *Biochim. Biophys. Acta*, **1553**, 177-182, doi: 10.1016/ s0005-2728(01)00250-x.
- 60. Mulkidjanian, A. Y. (2005) Ubiquinol oxidation in the cytochrome *bc*1 complex: reaction mechanism and prevention of short-circuiting, *Biochim. Biophys. Acta*, **1709**, 5-34, doi: 10.1016/j.bbabio.2005.03.009.
- Axelrod, H. L., Abresch, E. C., Paddock, M. L., Okamura, M. Y., and Feher, G. (2000) Determination of the binding sites of the proton transfer inhibitors Cd²⁺ and Zn²⁺ in bacterial reaction centers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97, 1542-1547, doi: 10.1073/pnas.97.4.1542.

TIME-RESOLVED ELECTROMETRIC STUDY OF $F \rightarrow O$ TRANSITION IN CYTOCHROME *c* OXIDASE. THE EFFECT OF Zn^{2+} IONS ON THE POSITIVE SIDE OF THE MEMBRANE

S. A. Siletsky^{1*} and R. B. Gennis²

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

² Department of Biochemistry, University of Illinois at Urbana-Champaign, Urbana, Illinois 61801, USA

The effect of Zn^{2+} on the P-side of proteoliposomes containing membrane-incorporated *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase was investigated by the time-resolved electrometrics following a single electron injection into the enzyme prepared in the F state. The wild-type enzyme was examined along with the two mutants, N139D and D132N. All obtained data indicate that the primary effect of Zn^{2+} added from the P-side of the membrane is slowing of the pumped proton release from the proton loading site (PLS) to the bulk aqueous phase on the P-side of the membrane. The results strongly suggest the presence of two pathways by which the pumped proton can exit the protein from the PLS and of two separate binding sites for Zn^{2+} . A model is presented to explain the influence of Zn^{2+} on the kinetics of membrane-potential generation by the wild-type COX, as well as by the N139D and D132N mutants.

Keywords: cytochrome c oxidase, zinc ions, proteoliposomes, electrogenic, proton pump, cytochrome aa_3 , *Rhodobacter sphaeroides*