

ГЕНЕРАЦИЯ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦИТОХРОМОМ *bd*

Обзор

© 2023 В.Б. Борисов

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

Поступила в редакцию 10.06.2023

После доработки 08.07.2023

Принята к публикации 11.07.2023

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

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

DOI: 10.31857/S032097252310007X, EDN: OTSSEC

ВВЕДЕНИЕ

В 1974 г. в НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского МГУ Л.А. Драчёв и соавторы разработали электрометрический метод прямого измерения электрической активности сопрягающих мембран, дающий уникальную возможность отслеживать внутрибелковое перемещение электрических зарядов в пределах одного молекулярного оборота фермента [1]. С помощью этого метода удалось наблюдать в реальном времени генерацию трансмембранной разности электрических потенциалов ($\Delta\psi$) бактериородопсином [2], реакционными центрами [3] и цитохромом *bc₁* [4] фотосинтезирующих бактерий, а также терминальной цитохром *c*-оксидазой [5–7] и неканоническими ретиналь-содержащими бактериальными белками [8, 9]. Для изучения электрогенного механизма цитохром *c*-оксидаз применяются два разных подхода. В первом подходе используется фотохимическая инъекция одного электрона во встроенный в липосому фермент. При этом в качестве непосред-

ственного фотоактивируемого восстановителя выступает трис(2,2'-бипиридил)рутений(II) хлорид ($Ru(bpy)_3$), образующий за счёт электростатических взаимодействий комплекс с сайтом связывания цитохрома *c* в оксидазе вблизи входного редокс-центра Cu_A [5, 6]. В результате фотовозбуждения $Ru(bpy)_3$ импульсным лазером электрон с $Ru(bpy)_3^*$ переносится на Cu_A . Окисленный $Ru(bpy)_3$ ревосстанавливается анилином. Этот подход позволяет регистрировать с разрешением во времени электрогенный перенос зарядов в ходе отдельных одноэлектронных переходов в каталитическом цикле цитохром *c*-оксидазы [7]. Во втором подходе для инициирования ферментативной реакции в режиме одного оборота используется лазерный импульсный фотолиз комплекса монооксида углерода (CO) с кислородсвязывающим высокоспиновым гемом a_3 . Образование комплекса CO с частично или полностью восстановленным ферментом происходит в анаэробных условиях. Затем в анаэробную ячейку с оксидазой, связавшей CO, вносят при помощи техники быстрого смешивания растворён-

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

ный в воде кислород (O_2). В ходе распада комплекса CO—оксидаза, запускаемого фотолизом, O_2 связывается с гемом a_3 и восстанавливается электронами, присутствующими в оксидазе, что сопровождается генерацией $\Delta\psi$ [10]. Таким образом, во втором подходе используется сочетание прямого электрометрического метода [1] и метода «флоу-флэш» [11]. У терминальных хинолоксидаз, в том числе цитохрома *bd*, которому и посвящён этот обзор, сайт связывания цитохрома *c* отсутствует. По этой причине для отслеживания перемещения электрических зарядов внутри их белковой молекулы первый подход неприменим.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ЦИТОХРОМА *bd*

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

Подобно электрон-транспортным цепям многих бактерий, аэробная дыхательная цепь *E. coli* разветвлена. Её терминальный участок в общем случае представлен тремя хинолоксидазами: гем-медным цитохромом *bo*₃ и двумя цитохромами *bd* — *bd*-I и *bd*-II [23, 24]. В отличие от оксидаз типа *bd*, цитохром *bo*₃ образует Δp по механизму протонного насоса, что позволяет двукратно увеличить стехиометрию пере-

качки протон/электрон (H^+/e^-) [25, 26]. Цитохромы *bo*₃, *bd*-I и *bd*-II кодируются оперонами *cyoABCDE*, *cydABX* и *appCBX* соответственно. *cyoABCDE* экспрессируется преимущественно при высоком парциальном давлении O_2 , тогда как *cydABX* — преимущественно в микроаэробных условиях. Экспрессия *appCBX* индуцируется при анаэробном росте *E. coli*, вступлении культуры в стационарную фазу роста и фосфатном голодании [24]. В последнее время появляется всё больше свидетельств того, что, помимо функционирования в качестве молекулярных преобразователей энергии, оксидазы типа *bd* принимают участие в других жизненно важных процессах в бактериальной клетке [27–30]. Цитохром *bd*-I вовлечён в образование дисульфидных связей при сворачивании белка [31], процесс биосинтеза гема [32], а также защиту бактерии от антибиотиков [33], пероксинитрита [34], монооксида азота [35–41] и аммиака [42]. Обе *bd*-оксидазы (*bd*-I и *bd*-II) также наделяют *E. coli* устойчивостью к цианиду [43], сульфиду [43–45] и перекиси водорода [46–54].

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

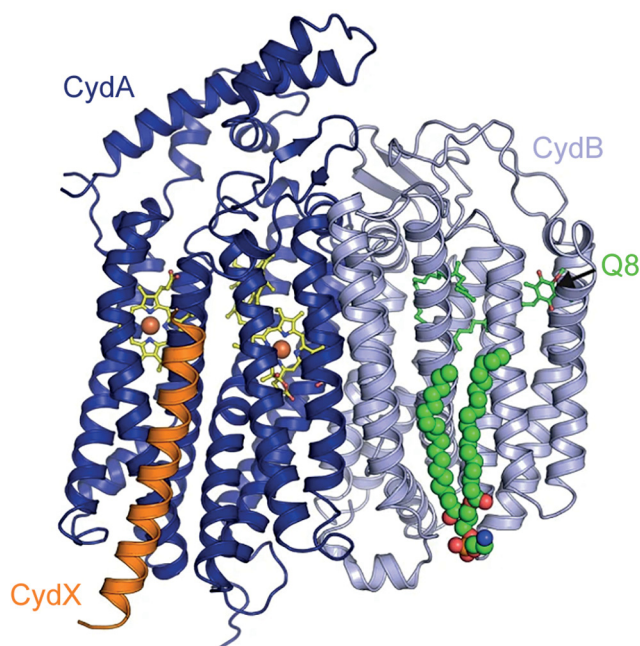


Рис. 1. Трёхмерная структура цитохрома *bd-I* *E. coli* с разрешением 3,3 Å (PDB ID 6RX4). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и d , связанных с субъединицей CydA, в структуре белка обнаруживаются убихинон-8 (Q8) и глицерофосфолипид (показан символами сферической формы), связанные с субъединицей CydB. Рисунок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

Theßeling et al. [55], таким лигандом служит Glu99. Гемы в белке расположены треугольником (рис. 3). Дополнительным структурным элементом в CydA/AppC является так называемая Q-петля. Она находится вблизи гема b_{558} и непосредственно участвует в связывании хинола, липофильного донора электронов. Другая большая субъединица, CydV/AppB, не обнаруживает в своём составе каких-либо металл-содержащих кофакторов. Вместо этого она несёт на себе прочно связанный убихинон-8 или деметилменахинон-8. Этот хинон занимает положение, эквивалентное сайту связывания гема в CydA/AppC, и, вероятно, играет роль в стабилизации структуры белка. Гем b_{558} является первичным акцептором электронов при окислении хинола. Гем d служит сайтом связывания O_2 и его последующего восстановления до $2H_2O$ [59, 60]. Гем d в цитохроме *bd-I* имеет необычайно высокое сродство к O_2 , при этом образующийся оксигенированный комплекс очень стабилен [61–64]. Функция гема b_{595} не вполне понятна. Слишком большое расстояние между центральными атомами Fe гемов b_{595} и d (10,9–11,3 Å), скорее всего, не позволяет им сформировать структурный биядерный центр, подобный таково-

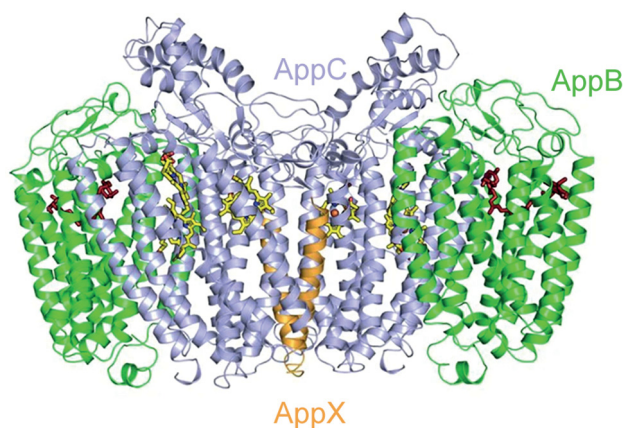


Рис. 2. Трёхмерная структура димера цитохрома *bd-II* *E. coli* с разрешением 3,0 Å (PDB ID 7OSE). Помимо гемов b_{558} , b_{595} и d , связанных с субъединицей AppC, в структуре белка обнаруживается убихинон-8 (показан красным цветом), связанный с субъединицей AppB. Рисунок взят из работы Grauel et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

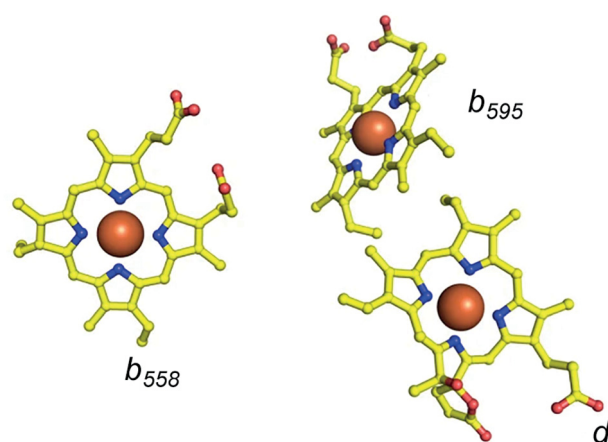


Рис. 3. Треугольное расположение гемов b_{558} , b_{595} и d в субъединице CydA цитохрома *bd-I* *E. coli*. Периплазма — сверху рисунка, цитоплазма — внизу рисунка. Рисунок взят из работы Theßeling et al. [55] в соответствии с лицензией Creative Commons Attribution 4.0 International License

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

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

Использование оптического и электрометрических методов в сочетании с методом «флоу-флэш» позволило наблюдать в реальном времени промежуточное образование и распад отдельных интермедиатов каталитического цикла цитохрома *bd-I E. coli* при температуре 21 °C [26, 80–83]. Предполагаемая схема последнего показана на рис. 4. В спектроскопических исследованиях гемопротеин находился в мицеллах детергента, а в электрометрических был встроен в липосомы. Исходно в эксперименте фермент переводился в полностью восстановленное состояние, в котором гем *d* был связан с CO (R^3 –CO, $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$ –CO). Фотолиз CO из этого состояния оксидазы приводит к промежуточному появлению формы цитохрома *bd-I*, не связанной с CO (R^3 , $b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$). Этот переход (R^3 –CO $\rightarrow$ R^3) не разрешается во времени как в спектрофотометрических, так и в электрометрических измерениях. В присутствии O₂ происходит связывание молекулы этого двухатомного газа с гемом *d*. В результате образуется оксигенированный комплекс – интермедиат A^3 ($b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+}$ –O₂). Скорость образования A^3 прямо пропорциональна концентрации O₂, при этом константа скорости второго порядка составляет около $2 \times 10^9 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ [64, 82]. Переход $R^3 \rightarrow A^3$ не сопровождается генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83]. A^3 быстро ($\tau \sim 4,5 \text{ мкс}$, τ – характеристическое время, обратное константе скорости, $t_{1/e}$) превращается в интермедиат, который Belevich et al. впервые описали и назвали соединением **P** [82]. Обнаружено, что переход $A^3 \rightarrow P$ также не сопряжён с генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83]. В отличие от генерации A^3 из R^3 , скорость образования соединения **P** не зависит от концентрации O₂. В ходе перехода $A^3 \rightarrow P$ гем b_{595} подвергается окислению, гем b_{558} остаётся в восстановленном состоянии, а новая кислородная форма гема *d* демонстрирует необычный максимум поглощения при 635 нм [82]. Единого мнения о химической структуре соединения **P** до сих пор нет. Belevich et al. в первоначальной работе [82] предположили, что **P** – истинный перекисный комплекс либо феррильный интермедиат с аминокислотным радикалом или катион-радикалом порфиринового кольца. Согласно более поздним данным Paulus et al. [84], соединение **P** представляет собой феррильную форму гема *d* с π -катион-радикалом на порфириновом кольце, которая находится в магнитном взаимодействии с гемом b_{595} . Важно

подчеркнуть, что Paulus et al. [84] наблюдали образование соединения **P** при температуре +1 °C, то есть в нефизиологических условиях. Возможно, что спектральный интермедиат **P**, появление которого в реальном времени зарегистрировали Belevich et al. [82], является смесью истинного перекисного комплекса ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}$ –O–O–(H)) и феррил π -катион-радикала ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{*4+}=O^{2-}$) при условии того, что они имеют схожие спектры поглощения. На следующей стадии **P** превращается ($\tau \sim 47 \text{ мкс}$) в нерадикальную форму феррильного комплекса гема *d* (соединение **F**), что сопровождается окислением гема b_{558} . Каталитический интермедиат **F**, скорее всего, имеет структуру $b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{4+}=O^{2-}$. Переход **P** $\rightarrow$ **F** сопряжён с генерацией $\Delta\psi$ [26, 82, 83].

bd-Оксидаза имеет в своём составе три гема. Поэтому если выделенный фермент не содержит связанного хинола, то можно ожидать, что в полностью восстановленном состоянии он несёт на себе три электрона (R^3). В этом случае реакция R^3 с O₂ останавливается на образовании соединения **F** [80]. Если же цитохром *bd-I* включает в себя молекулу связанного хинола, являющегося двухэлектронным донором, то его окисление в присутствии O₂ позволяет осуществить превращение **F** в интермедиат A^1 с $\tau \sim 0,6$ – $1,1 \text{ мс}$ [81, 82]. A^1 , вероятно, представляет собой одноэлектронную форму оксидазы с оксикомплексом

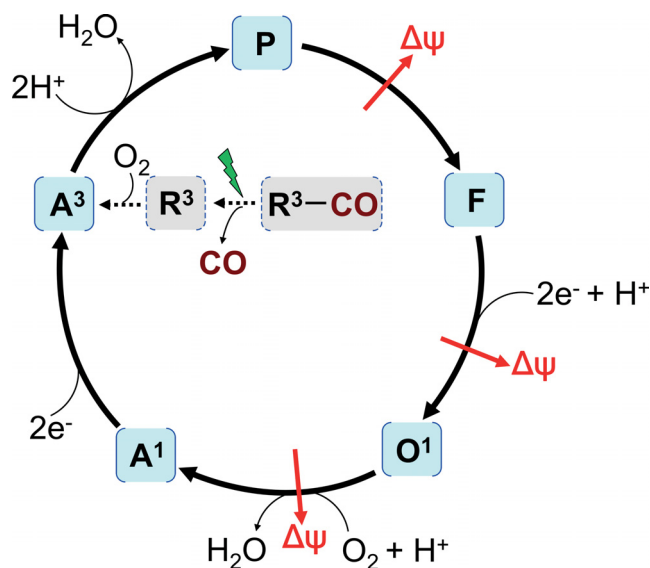


Рис. 4. Каталитический цикл цитохрома *bd-I E. coli*. Соединения A^3 , **P**, **F**, O^1 , A^1 – каталитические интермедиаты фермента. Соединения R^3 и R^3 –CO не являются частью каталитического цикла оксидазы, но могут быть получены искусственным путём. Красные «стрелки сопряжения» обозначают генерацию $\Delta\psi$ при переходах **P** $\rightarrow$ **F** и **F** $\rightarrow$ A^1 . Структура соединений обсуждается в тексте обзора

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

Обнаружено, что в стационарных условиях в присутствии O_2 и убихинола-1 основными каталитическими интермедиатами цитохрома $bd-I$ являются F и A^1 (каждый составляет примерно по 40% от общего количества) [60]. При этом около 20% оксидазы, вероятно, находится в состоянии O^1 — одноэлектронной форме с окисленным гемом d ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+}-OH$). Состояние O^1 в экспериментах в режиме одного оборота с использованием метода «флуо-флэш» зарегистрировано не было [80, 82, 83]. Тем не менее в настоящее время принято думать, что O^1 , по-видимому, также является каталитическим интермедиатом цитохрома $bd-I$ (рис. 4). Стоит также отметить, что форма R^3 фермента, скорее всего, не входит в число его каталитических интермедиатов [59, 60], однако для нужд эксперимента может быть легко произведена искусственным путём.

В 2005 г. Belevich et al. [81] на основании полученных результатов постулировали существование внутрибелкового протон-проводящего пути для переноса H^+ из цитоплазмы в кислородоредуктазный центр цитохрома $bd-I$. Авторы предположили, что такое перемещение H^+ поперёк мембраны, сопряжённое с переносом электрона с гема b_{558} на гемы b_{595} и d , сопровождается генерацией $\Delta\psi$, наблюдаемой в экспериментах [26, 80–83]. Выброс H^+ в периплазматическое пространство при окислении хинола ферментом также вносит вклад в создание Δp . Опубликованные в 2019 г. трёхмерные структуры $bd-I$ -оксидазы с разрешением 2,68 Å (PDB ID 6RKO) [56] и 3,3 Å (PDB ID 6RX4) [55] подтвердили гипотезу, выдвинутую Belevich et al. [81]. В структурах видна цепочка молекул воды, тянущаяся вдоль гидрофильного протон-проводящего пути, который начинается в цитоплазматическом интерфейсе между субъединицами $CydA$ и $CydB$ и проходит перпендикулярно плоскости мембраны к гему d . Этот протон-проводящий путь составляют несколько гидрофильных аминокислотных остатков (рис. 5). С цитоплазматической стороны путь начинается с $Asp119^{CydA}$, затем, по-видимому, в его состав входят $Lys57^{CydA}$, $Lys109^{CydA}$, $Asp105^{CydA}$, $Tyr379^{CydB}$ и, наконец, $Asp58^{CydB}$, с которого протоны, вероятно, поступают на пропионатную группу гема d [55]. Высказано предположение, что консервативные гидрофильные остатки $Ser108^{CydA}$, $Glu107^{CydA}$ и $Ser140^{CydA}$ также относятся к этому пути,

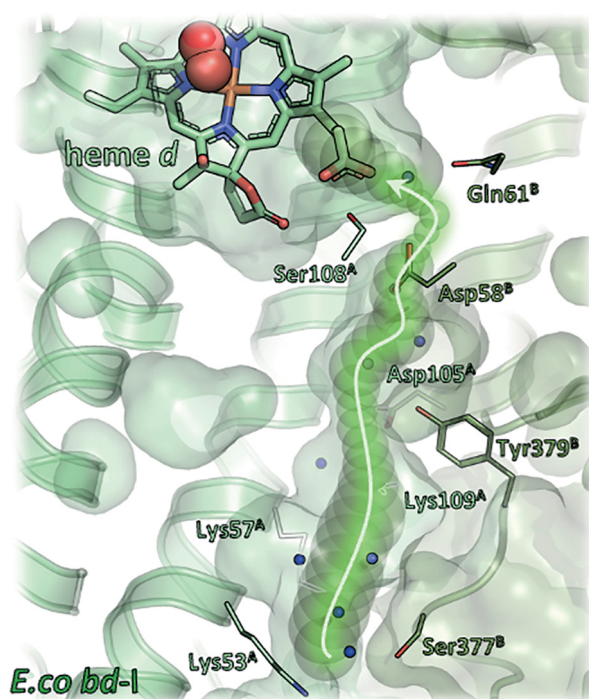


Рис. 5. Предполагаемый протон-проводящий путь в цитохроме $bd-I$ *E. coli*. Путь выстлан боковыми цепями нескольких гидрофильных аминокислот и позволяет переносить протоны с цитоплазматической стороны мембраны к пропионату гема d . В нём также обнаруживаются многочисленные молекулы воды (обозначены символами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

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

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

Как указано выше, $Glu445^{CydA}$ — аксиальный лиганд железа гема b_{595} [55, 56]. Его замена на Ala в субъединице $CydA$ приводит к инактивации фермента. При этом гем b_{595} удерживается в белке, но теряет способность к восстановлению даже в присутствии сильного донора электронов — дитионита, добавленного в избытке [81]. Как и в случае цитохрома $bd-I$ дикого типа, в реакции восстановленного мутантного фермента $Glu445Ala$ с кислородом наблюдается начальная неэлектрогенная стадия,

состоящая из переходов $R^3 \rightarrow A^3$ и $A^3 \rightarrow P$. Однако у мутанта, в отличие от дикого типа, при генерации $\Delta\psi$ не выявляется микросекундная фаза. Вместо этого у мутантной формы наблюдается более медленная, небольшая электрогенная фаза ($\tau \sim 1,3$ мс; амплитуда — 0,36 мВ), за которой следует электрогенный переход гораздо большей амплитуды ($\tau \sim 12,5$ мс; амплитуда — 1,7 мВ). Обе электрогенные фазы, скорее всего, отражают переход $P \rightarrow F$ в разных субпопуляциях фермента Glu445Ala [81]. Таким образом, замена Glu445 на Ala сильно ингибирует перенос заряда поперёк мембраны, сопряжённый с окислением цитохрома *bd-I* кислородом.

Аналогично, замена Glu107 на Leu в субъединице CudA ведёт к потере цитохромом *bd-I* хинолоксидазной активности. Полностью восстановленная мутантная форма Glu107Leu белка (R^3) связывает O_2 примерно с той же скоростью, что и фермент дикого типа. Однако образование феррильного интермедиата (F) в мутантной оксидазе, как полагают, существенно замедляется в сравнении с ферментом дикого типа. Об этом свидетельствуют результаты спектрофотометрических экспериментов, согласно которым продукции соединения F в 100-микросекундной временной шкале у мутантной оксидазы не наблюдается, в отличие от белка дикого типа [83]. Этот вывод согласуется с тем фактом, что скорость генерации $\Delta\psi$ (основной фазы) мутантной оксидазой примерно в 350 раз ниже, чем таковая, измеренная для фермента дикого типа [83].

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

МОЖЕТ ЛИ ЦИТОХРОМ *bd-II* ИЗ *E. coli* ГЕНЕРИРОВАТЬ $\Delta\psi$?

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

равно 0, то есть он является несопряжённой хинолоксидазой. При этом известно, что цитохромы *bd-I* и bo_3 *E. coli* — сопряжённые хинолоксидазы, со значениями H^+/e^- 1 и 2 соответственно [25, 26]. Bekker et al. сконструировали мутантный штамм *E. coli* MB37, в дыхательной цепи которого присутствовал цитохром *bd-II*, но отсутствовали все известные на тот момент первичные генераторы протонного потенциала: NADH-дегидрогеназа 1 (NDH-1), цитохром bo_3 и цитохром *bd-I*. Авторы вычисляли H^+/e^- , используя сравнительные значения специфических скоростей потребления кислорода и синтеза АТФ штамма MB37 с другими мутантными штаммами *E. coli*, для которых уже были измерены величины H^+/e^- [85]. Бактериальные клетки всех штаммов росли в одинаковых условиях, а скорость синтеза АТФ рассчитывали из скоростей образования продуктов метаболизма — CO_2 , ацетата, этанола и лактата. Неожиданным оказалось следующее наблюдение: штамм MB37, который, по предположению авторов работы, должен был обладать полностью несопряжённой аэробной дыхательной цепью, оказался способен к росту в аэробных условиях на несбраживаемых субстратах. Однако возникает вопрос: как же в таком случае обеспечивается синтез АТФ? Bekker et al. выдвинули гипотезу [85], согласно которой АТФ в штамме MB37 продуцируется исключительно за счёт субстратного фосфорилирования. В более поздней работе Shepherd et al. [86] предположили, что в этом мутантном штамме протонный потенциал образуется за счёт функционирования электрогенного антипортера, который переносит внутрь клетки анион глутаминовой кислоты (глутамат) в обмен на выброс из клетки нейтральной γ -аминомасляной кислоты (ГАМК). При этом ГАМК в клетке синтезируется из глутамата, в процессе чего потребляется внутриклеточный протон.

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

ных условиях альтернативные механизмы образования АТР, предложенные в работах Bekker et al. и Shepherd et al. [85, 86], не требуются.

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

Благодарность. Автор хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность М.И. Верховскому (безвременно ушедшему), И.Н. Бе-

левичу, Н.П. Белевичу, Д.А. Блоху (безвременно ушедшему) и А. Ясайтису за то чудесное время, которое мы провели, измеряя электрогенную активность загадочного цитохрома *bd*.

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

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A. Y., and Skulachev, V. P. (1974) Direct measurement of electric current generation by cytochrome oxidase, H^+ -ATPase and bacteriorhodopsin, *Nature*, **249**, 321–324, doi: 10.1038/249321a0.
2. Drachev, L. A., Kaulen, A. D., Khitrina, L. V., and Skulachev, V. P. (1981) Fast stages of photoelectric processes in biological membranes. I. Bacteriorhodopsin, *Eur. J. Biochem.*, **117**, 461–470, doi: 10.1111/j.1432-1033.1981.tb06361.x.
3. Dracheva, S. M., Drachev, L. A., Konstantinov, A. A., Semenov, A. Y., Skulachev, V. P., Arutjunjan, A. M., Shulalov, V. A., and Zaberezhnaya, S. M. (1988) Electrogenic steps in the redox reactions catalyzed by photosynthetic reaction-centre complex from *Rhodospseudomonas viridis*, *Eur. J. Biochem.*, **171**, 253–264, doi: 10.1111/j.1432-1033.1988.tb13784.x.
4. Mulikidjanian, A. Y., Mamedov, M. D., Semenov, A. Y., Shinkarev, V. P., Verkhovsky, M. I., and Drachev, L. A. (1990) Partial reversion of the electrogenic reaction in the ubiquinol: cytochrome c_2 -oxidoreductase of *Rhodobacter sphaeroides* chromatophores under neutral and alkaline conditions, *FEBS Lett.*, **277**, 127–130, doi: 10.1016/0014-5793(90)80825-4.
5. Zaslavsky, D., Kaulen, A. D., Smirnova, I. A., Vygodina, T., and Konstantinov, A. A. (1993) Flash-induced membrane potential generation by cytochrome c oxidase, *FEBS Lett.*, **336**, 389–393, doi: 10.1016/0014-5793(93)80843-j.
6. 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.
7. Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps couples to conversion of cytochrome c oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853–4861, doi: 10.1021/bi982614a.
8. Bogachev, A. V., Bertsova, Y. V., Verkhovskaya, M. L., Mamedov, M. D., and Skulachev, V. P. (2016) Real-time kinetics of electrogenic Na^+ transport by rhodopsin from the marine flavobacterium *Dokdonia* sp. PRO95, *Sci. Rep.*, **6**, 21397, doi: 10.1038/srep21397.
9. Siletsky, S. A., Lukashev, E. P., Mamedov, M. D., Borisov, V. B., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2021) His57 controls the efficiency of ESR, a light-driven proton pump from *Exiguobacterium sibiricum* at low and high pH, *Biochim. Biophys. Acta Bioenerg.*, **1862**, 148328, doi: 10.1016/j.bbabi.2020.148328.
10. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M., and Wikstrom, M. (1997) Translocation of electrical charge during a single turnover of cytochrome- c oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 6–10, doi: 10.1016/S0005-2728(96)00147-8.
11. Gibson, Q., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.*, **86**, 541–554, doi: 10.1042/bj0860541.
12. 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.
13. Azarkina, N. V., Borisov, V. B., Oleynikov, I. P., Sudakov, R. V., and Vygodina, T. V. (2023) Interaction of terminal oxidases with amphipathic molecules, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 6428, doi: 10.3390/ijms24076428.
14. Zharova, T. V., Grivennikova, V. G., and Borisov, V. B. (2023) F1-Fo ATP Synthase/ATPase: contemporary view on unidirectional catalysis, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 5417, doi: 10.3390/ijms24065417.
15. Arutyunyan, A. M., Sakamoto, J., Inadome, M., Kabashima, Y., and Borisov, V. B. (2012) Optical and magneto-optical activity of cytochrome *bd* from *Geobacillus thermodenitrificans*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 2087–2094, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.06.009.
16. 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.
17. Murali, R., Gennis, R. B., and Hemp, J. (2021) Evolution of the cytochrome *bd* oxygen reductase superfamily and the function of CydAA' in Archaea, *ISME J.*, **15**, 3534-3548, doi: 10.1038/s41396-021-01019-4.
 18. Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) Proton pumping and non-pumping terminal respiratory oxidases: Active sites intermediates of these molecular machines and their derivatives, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 10852, doi: 10.3390/ijms221910852.
 19. Forte, E., Borisov, V. B., Vicente, J. B., and Giuffre, A. (2017) Cytochrome *bd* and gaseous ligands in bacterial physiology, *Adv. Microb. Physiol.*, **71**, 171-234, doi: 10.1016/bs.ampbs.2017.05.002.
 20. Borisov, V. B., Gennis, R. B., Hemp, J., and Verkhovskiy, M. I. (2011) The cytochrome *bd* respiratory oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1398-1413, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.06.016.
 21. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Paiardini, A., Hoogewijs, D., Forte, E., Giuffre, A., and Poole, R. K. (2021) Bacterial oxidases of the cytochrome *bd* family: Redox enzymes of unique structure, function and utility as drug targets, *Antioxid. Redox Signal.*, **34**, 1280-1318, doi: 10.1089/ars.2020.8039.
 22. Friedrich, T., Wohlwend, D., and Borisov, V. B. (2022) Recent advances in structural studies of cytochrome *bd* and its potential application as a drug target, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 3166, doi: 10.3390/ijms23063166.
 23. Borisov, V. B. (1996) Cytochrome *bd*: structure and properties, *Biochemistry (Moscow)*, **61**, 565-574.
 24. Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2015) Oxygen as acceptor, *EcoSal Plus*, **6**, doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0012-2015.
 25. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R. B., and Wikstrom, M. (1991) Properties of the two terminal oxidases of *Escherichia coli*, *Biochemistry*, **30**, 3936-3942, doi: 10.1021/bi00230a019.
 26. Borisov, V. B., Murali, R., Verkhovskaya, M. L., Bloch, D. A., Han, H., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2011) Aerobic respiratory chain of *Escherichia coli* is not allowed to work in fully uncoupled mode, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **108**, 17320-17324, doi: 10.1073/pnas.1108217108.
 27. Forte, E., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., Brunori, M., Giuffre, A., and Sarti, P. (2007) Cytochrome *bd*, a key oxidase in bacterial survival and tolerance to nitrosative stress, *Ital. J. Biochem.*, **56**, 265-269.
 28. Giuffre, A., Borisov, V. B., Mastronicola, D., Sarti, P., and Forte, E. (2012) Cytochrome *bd* oxidase and nitric oxide: From reaction mechanisms to bacterial physiology, *FEBS Lett.*, **586**, 622-629, doi: 10.1016/j.febslet.2011.07.035.
 29. Giuffre, A., Borisov, V. B., Arese, M., Sarti, P., and Forte, E. (2014) Cytochrome *bd* oxidase and bacterial tolerance to oxidative and nitrosative stress, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 1178-1187, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.01.016.
 30. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Arese, M., Davletshin, A. I., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* protects bacteria against oxidative and nitrosative stress: a potential target for next-generation antimicrobial agents, *Biochemistry (Moscow)*, **80**, 565-575, doi: 10.1134/S0006297915050077.
 31. Bader, M., Muse, W., Ballou, D. P., Gassner, C., and Bardwell, J. C. A. (1999) Oxidative protein folding is driven by the electron transport system, *Cell*, **98**, 217-227, doi: 10.1016/S0092-8674(00)81016-8.
 32. Mobius, K., Arias-Cartin, R., Breckau, D., Hannig, A. L., Riedmann, K., Biedendieck, R., Schroder, S., Becher, D., Magalon, A., Moser, J., Jahn, M., and Jahn, D. (2010) Heme biosynthesis is coupled to electron transport chains for energy generation, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 10436-10441, doi: 10.1073/pnas.1000956107.
 33. Seregina, T. A., Lobanov, K. V., Shakulov, R. S., and Mironov, A. S. (2022) Inactivation of terminal oxidase *bd*-I leads to supersensitivity of *E. coli* to quinolone and beta-lactam antibiotics, *Mol. Biol. (Mosk)*, **56**, 619-627, doi: 10.1134/S0026893322040100.
 34. Borisov, V. B., Forte, E., Siletsky, S. A., Sarti, P., and Giuffre, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182-188, doi: 10.1016/j.bbabi.2014.10.006.
 35. Borisov, V. B., Forte, E., Konstantinov, A. A., Poole, R. K., Sarti, P., and Giuffre, A. (2004) Interaction of the bacterial terminal oxidase cytochrome *bd* with nitric oxide, *FEBS Lett.*, **576**, 201-204, doi: 10.1016/j.febslet.2004.09.013.
 36. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2006) Nitric oxide reacts with the ferryl-oxo catalytic intermediate of the Cu_B-lacking cytochrome *bd* terminal oxidase, *FEBS Lett.*, **580**, 4823-4826, doi: 10.1016/j.febslet.2006.07.072.
 37. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., Brunori, M., Konstantinov, A. A., and Giuffre, A. (2007) Redox control of fast ligand dissociation from *Escherichia coli* cytochrome *bd*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **355**, 97-102, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.01.118.
 38. Mason, M. G., Shepherd, M., Nicholls, P., Dobbin, P. S., Dodsworth, K. S., Poole, R. K., and Cooper, C. E. (2009) Cytochrome *bd* confers nitric oxide resistance to *Escherichia coli*, *Nat. Chem. Biol.*, **5**, 94-96, doi: 10.1038/nchembio.135.
 39. Borisov, V. B., Forte, E., Giuffre, A., Konstantinov, A., and Sarti, P. (2009) Reaction of nitric oxide with the oxidized di-heme and heme-copper oxygen-reducing centers of terminal oxidases: different reaction pathways and end-products, *J. Inorg. Biochem.*, **103**, 1185-1187, doi: 10.1016/j.jinorgbio.2009.06.002.

40. Shepherd, M., Achard, M. E., Idris, A., Totsika, M., Phan, M. D., Peters, K. M., Sarkar, S., Ribeiro, C. A., Holyoake, L. V., Ladakis, D., Ulett, G. C., Sweet, M. J., Poole, R. K., McEwan, A. G., and Schembri, M. A. (2016) The cytochrome *bd*-I respiratory oxidase augments survival of multidrug-resistant *Escherichia coli* during infection, *Sci. Rep.*, **6**, 35285, doi: 10.1038/srep35285.
41. Borisov, V. B., and Forte, E. (2022) Bioenergetics and reactive nitrogen species in bacteria, *Int. J. Mol. Sci.*, **23**, 7321, doi: 10.3390/ijms23137321.
42. Forte, E., Siletsky, S. A., and Borisov, V. B. (2021) In *Escherichia coli* ammonia inhibits cytochrome *bo*₃ but activates cytochrome *bd*-I, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 13, doi: 10.3390/antiox10010013.
43. Forte, E., Borisov, V. B., Falabella, M., Colaco, H. G., Tinajero-Trejo, M., Poole, R. K., Vicente, J. B., Sarti, P., and Giuffre, A. (2016) The terminal oxidase cytochrome *bd* promotes sulfide-resistant bacterial respiration and growth, *Sci. Rep.*, **6**, 23788, doi: 10.1038/srep23788.
44. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Terminal oxidase cytochrome *bd* protects bacteria against hydrogen sulfide toxicity, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 22-32, doi: 10.1134/S000629792101003X.
45. Borisov, V. B., and Forte, E. (2021) Impact of hydrogen sulfide on mitochondrial and bacterial bioenergetics, *Int. J. Mol. Sci.*, **22**, 12688, doi: 10.3390/ijms222312688.
46. 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.
47. 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.
48. Lindqvist, A., Membrillo-Hernandez, J., Poole, R. K., and Cook, G. M. (2000) Roles of respiratory oxidases in protecting *Escherichia coli* K12 from oxidative stress, *Antonie Van Leeuwenhoek*, **78**, 23-31, doi: 10.1023/a:1002779201379.
49. 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.
50. Borisov, V. B., Forte, E., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase from *Escherichia coli* displays high catalase activity: an additional defense against oxidative stress, *FEBS Lett.*, **587**, 2214-2218, doi: 10.1016/j.febslet.2013.05.047.
51. Forte, E., Borisov, V. B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffre, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e01006-01013, doi: 10.1128/mBio.01006-13.
52. 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.
53. Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Nastasi, M. R., and Forte, E. (2021) ROS defense systems and terminal oxidases in bacteria, *Antioxidants (Basel)*, **10**, 839, doi: 10.3390/antiox10060839.
54. Forte, E., Nastasi, M. R., and Borisov, V. B. (2022) Preparations of terminal oxidase cytochrome *bd*-II isolated from *Escherichia coli* reveal significant hydrogen peroxide scavenging activity, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 720-730, doi: 10.1134/S0006297922080041.
55. Theßeling, A., Rasmussen, T., Burschel, S., Wohlwend, D., Kagi, J., Muller, R., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2019) Homologous *bd* oxidases share the same architecture but differ in mechanism, *Nat. Commun.*, **10**, 5138, doi: 10.1038/s41467-019-13122-4.
56. Safarian, S., Hahn, A., Mills, D. J., Radloff, M., Eisinger, M. L., Nikolaev, A., Meier-Credo, J., Melin, F., Miyoshi, H., Gennis, R. B., Sakamoto, J., Langer, J. D., Hellwig, P., Kuhlbrandt, W., and Michel, H. (2019) Active site rearrangement and structural divergence in prokaryotic respiratory oxidases, *Science*, **366**, 100-104, doi: 10.1126/science.aay0967.
57. Grauel, A., Kagi, J., Rasmussen, T., Makarchuk, I., Oppermann, S., Moumbock, A. F. A., Wohlwend, D., Muller, R., Melin, F., Gunther, S., Hellwig, P., Bottcher, B., and Friedrich, T. (2021) Structure of *Escherichia coli* cytochrome *bd*-II type oxidase with bound aurachin D, *Nat. Commun.*, **12**, 6498, doi: 10.1038/s41467-021-26835-2.
58. Grund, T. N., Radloff, M., Wu, D., Goojani, H. G., Witte, L. F., Josting, W., Buschmann, S., Muller, H., Elamri, I., Welsch, S., Schwalbe, H., Michel, H., Bald, D., and Safarian, S. (2021) Mechanistic and structural diversity between cytochrome *bd* isoforms of *Escherichia coli*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **118**, e2114013118, doi: 10.1073/pnas.2114013118.
59. Yang, K., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Gennis, R. B. (2008) The fully oxidized form of the cytochrome *bd* quinol oxidase from *E. coli* does not participate in the catalytic cycle: direct evidence from rapid kinetics studies, *FEBS Lett.*, **582**, 3705-3709, doi: 10.1016/j.febslet.2008.09.038.
60. Borisov, V. B., Forte, E., Sarti, P., and Giuffre, A. (2011) Catalytic intermediates of cytochrome *bd* terminal oxidase at steady-state: Ferryl and oxy-ferrous species dominate, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 503-509, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.02.007.
61. Borisov, V. B., Smirnova, I. A., Krasnosel'skaya, I. A., and Konstantinov, A. A. (1994) Oxygenated cytochrome *bd* from *Escherichia coli* can be converted into the oxidized form by lipophilic electron acceptors, *Biochemistry (Moscow)*, **59**, 437-443.
62. D'mello, R., Hill, S., and Poole, R. K. (1996) The cytochrome *bd* quinol oxidase in *Escherichia coli* has

- an extremely high oxygen affinity and two-oxygen-binding haems: implications for regulation of activity *in vivo* by oxygen inhibition, *Microbiology*, **142**, 755-763, doi: 10.1099/00221287-142-4-755.
63. Belevich, I., Borisov, V. B., Konstantinov, A. A., and Verkhovsky, M. I. (2005) Oxygenated complex of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*: stability and photolability, *FEBS Lett.*, **579**, 4567-4570, doi: 10.1016/j.febslet.2005.07.011.
 64. 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.
 65. Siletsky, S. A., Zaspas, 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.
 66. 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.
 67. 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.
 68. Muntyan, M. S., Bloch, D. A., Drachev, L. A., and Skulachev, V. P. (1993) Kinetics of CO binding to putative Na⁺-motive oxidases of the *o*-type from *Bacillus FTU* and of the *d*-type from *Escherichia coli*, *FEBS Lett.*, **327**, 347-350, doi: 10.1016/0014-5793(93)81018-u.
 69. 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.
 70. 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.
 71. 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.
 72. Borisov, V. B., Sedelnikova, S. E., Poole, R. K., and Konstantinov, A. A. (2001) Interaction of cytochrome *bd* with carbon monoxide at low and room temperatures: evidence that only a small fraction of heme *b*₅₉₅ reacts with CO, *J. Biol. Chem.*, **276**, 22095-22099, doi: 10.1074/jbc.M011542200.
 73. Borisov, V. B., Liebl, U., Rappaport, F., Martin, J. L., Zhang, J., Gennis, R. B., Konstantinov, A. A., and Vos, M. H. (2002) Interactions between heme *d* and heme *b*₅₉₅ in quinol oxidase *bd* from *Escherichia coli*: a photoselection study using femtosecond spectroscopy, *Biochemistry*, **41**, 1654-1662, doi: 10.1021/bi0158019.
 74. Arutyunyan, A. M., Borisov, V. B., Novoderezhkin, V. I., Ghaim, J., Zhang, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2008) Strong excitonic interactions in the oxygen-reducing site of *bd*-type oxidase: the Fe-to-Fe distance between hemes *d* and *b*₅₉₅ is 10 Å, *Biochemistry*, **47**, 1752-1759, doi: 10.1021/bi701884g.
 75. 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.
 76. 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.bbabbio.2009.05.003.
 77. 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.bbabbio.2010.05.010.
 78. 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.
 79. 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.
 80. 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.
 81. Belevich, I., Borisov, V. B., Zhang, J., Yang, K., Konstantinov, A. A., Gennis, R. B., and Verkhovsky, M. I. (2005) Time-resolved electrometric and optical studies on cytochrome *bd* suggest a mechanism of electron-proton coupling in the di-heme active site, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 3657-3662, doi: 10.1073/pnas.0405683102.
 82. Belevich, I., Borisov, V. B., and Verkhovsky, M. I. (2007) Discovery of the true peroxy intermediate in the catalytic cycle of terminal oxidases by real-time measurement, *J. Biol. Chem.*, **282**, 28514-28519, doi: 10.1074/jbc.M705562200.
 83. Borisov, V. B., Belevich, I., Bloch, D. A., Mogi, T., and Verkhovsky, M. I. (2008) Glutamate 107 in

- subunit I of cytochrome *bd* from *Escherichia coli* is part of a transmembrane intraprotein pathway conducting protons from the cytoplasm to the heme *b₅₉₅*/heme *d* active site, *Biochemistry*, **47**, 7907-7914, doi: 10.1021/bi800435a.
84. Paulus, A., Rossius, S. G., Dijk, M., and de Vries, S. (2012) Oxoferryl-porphyrin radical catalytic intermediate in cytochrome *bd* oxidases protects cells from formation of reactive oxygen species, *J. Biol. Chem.*, **287**, 8830-8838, doi: 10.1074/jbc.M111.333542.
 85. Bekker, M., de Vries, S., Ter Beek, A., Hellingwerf, K. J., and de Mattos, M. J. (2009) Respiration of *Escherichia coli* can be fully uncoupled via the nonelectrogenic terminal cytochrome *bd*-II oxidase, *J. Bacteriol.*, **191**, 5510-5517, doi: 10.1128/JB.00562-09.
 86. Shepherd, M., Sanguinetti, G., Cook, G. M., and Poole, R. K. (2010) Compensations for diminished terminal oxidase activity in *Escherichia coli*: cytochrome *bd*-II-mediated respiration and glutamate metabolism, *J. Biol. Chem.*, **285**, 18464-18472, doi: 10.1074/jbc.M110.118448.

MEMBRANE POTENTIAL GENERATION BY CYTOCHROME *bd*

Review

V. B. Borisov

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

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

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