

ЦИТОХРОМ *bd* ЗАЩИЩАЕТ БАКТЕРИИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО И НИТРОЗИЛИРУЮЩЕГО СТРЕССА: ПОТЕНЦИАЛЬНАЯ МИШЕНЬ ДЛЯ АНТИМИКРОБНЫХ ПРЕПАРАТОВ НОВОГО ПОКОЛЕНИЯ

Обзор

© 2015 В.Б. Борисов^{1*}, Е. Форте², С.А. Силецкий¹, М. Арезе²,
А.И. Давлетшин^{1,3}, П. Сарти^{2,4}, А. Жуффре⁴

¹ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского,
119991 Москва; факс: +7(495)939-3181,
электронная почта: bor@genebee.msu.su

² Римский университет Ла Сапиенца, Отдел биохимических наук
и Институт Пастера – Фонд Ченчи Болоньетти, Италия, I-00185 Рим

³ Российский государственный гуманитарный университет,
Институт восточных культур и античности, 125993 Москва

⁴ Институт молекулярной биологии и патологии НИС,
Италия, I-00185 Рим

Поступила в редакцию 22.12.14

После доработки 23.01.15

Цитохром *bd* – терминальная хинол-оксидаза дыхательной цепи бактерий. Этот трехгемовый интегральный мембранный белок генерирует протон-движущую силу с более низкой эффективностью, чем гем-медные оксидазы. Тем не менее в неблагоприятных условиях роста бактерии часто используют в качестве основной терминальной оксидазы цитохром *bd* вместо гем-медных ферментов. В особенности это относится к некоторым патогенным и условно-патогенным бактериям в ходе колонизации ими клеток хозяина. В этом обзоре суммированы последние данные о вкладе цитохрома *bd* в устойчивость бактерий к перекиси водорода, оксиду азота и пероксинитриту, вредным соединениям, вырабатываемым хозяином как часть иммунного ответа на микробные инфекции. Появляется все больше свидетельств в подтверждение гипотезы о том, что оксидазы типа *bd* способствуют вирулентности бактерий, содействуя выживанию микробов в условиях окислительного и нитрозилирующего стресса. По этим причинам цитохром *bd* представляет собой белок-мишень для разработки противомикробных препаратов нового поколения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: окислительный стресс, нитрозилирующий стресс, активные формы кислорода и азота, дыхательная цепь, терминальная оксидаза, бактерии, вирулентность, антимикробные препараты.

ОБЩИЕ СВОЙСТВА

Цитохром *bd* – хинол:O₂ оксидоредуктаза дыхательной цепи прокариот [1–3], которая еще не обнаружена в эукариотических организмах [4]. Фермент катализирует реакцию четырехэлектронного восстановления молекулярного кислорода до воды, используя хинолы в качестве до-

норов электронов [5, 6]. Энергия, выделяющаяся в этой редокс-реакции, запасается в виде трансмембранной разности электрических потенциалов [7] посредством молекулярного механизма, который до конца не расшифрован. Предполагается, что мембранный потенциал в основном создается за счет векторного перемещения протонов по протонпроводящему пути, идущему из цитоплазмы к активному центру, расположенному на противоположной, периплазматической стороне мембраны [8–12]. Установлено, что в отличие от гем-медных оксидаз цитохром *bd* не функционирует как протонный насос [8–15]. Таким образом, он работает с более

Принятые сокращения: ТМФД – N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин; *k* – наблюдаемая константа скорости; *K*_i – кажущаяся константа ингибирования; ONOO⁻ – пероксинитрит.

* Адресат для корреспонденции.

низкой энергетической эффективностью по сравнению с гем-медными дыхательными ферментами. Для цитохрома *bd* соотношение H^+/e^- (число переносимых через мембрану протонов при транспорте одного электрона) равно 1, тогда как для большинства гем-медных оксидаз $H^+/e^- = 2$ [12, 16–19].

Цитохром *bd* оксидазы обнаруживаются как у безвредных, так и у патогенных бактерий, в числе которых *Mycobacterium tuberculosis* [20], *Klebsiella pneumoniae* [21], *Shigella flexneri* [22], *Listeria monocytogenes* [23], *Streptococcus* [24], *Brucella* [25, 26], *Salmonella* [27, 28] и представители класса *Bacteroides* [29]. У этих патогенов отмечена положительная корреляция между вирулентностью и уровнем экспрессии цитохрома *bd* [30].

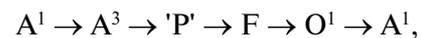
Экспрессия цитохрома *bd* усиливается при неблагоприятных условиях роста, например, при низком давлении кислорода, в присутствии ядов (цианида) [31] или разобщителей (протонофор) [32] в окружающей среде, при защелачивании среды [31] или высокой температуре [33]. У азотфиксирующих бактерий цитохром *bd* вносит вклад в защиту нитрогеназы от инактивации кислородом [34–36]. Также обнаружено, что цитохром *bd* оксидаза расширяет диапазон концентраций кислорода, при котором могут расти аноксигенные фототрофные бактерии [37]. Более того, цитохром *bd*-I из *E. coli* участвует в регуляции процесса образования дисульфидных связей при сворачивании белков [38], а также биосинтеза гема (а именно на уровне фермента протопорфириноген IX оксидазы) [39].

Трехмерная структура цитохрома *bd* пока неизвестна. Этот фермент не проявляет гомологии ни с одной из гем-медных или альтернативных цианид-резистентных терминальных оксидаз [1, 7, 40, 41]. Ферменты из *E. coli* и *Azotobacter vinelandii* в основном изолируют в виде стабильных оксигенированных комплексов [42–44]. Это, вероятно, происходит из-за высокого сродства фермента к кислороду [45, 46]. Наиболее подробно изучен цитохром *bd*-I из *E. coli*. До последнего времени считалось, что фермент состоит только из двух разных интегральных мембранных полипептидов, субъединиц I (CydA, 57 кДа) и II (CydB, 43 кДа). Однако совсем недавно было показано, что цитохром *bd* содержит дополнительный полипептид CydX (4 кДа) [47, 48]. Предполагается, что этот маленький полипептид – третья субъединица оксидазы, поскольку он необходим для поддержания активности фермента и стабилизации гемовых простетических групп [47–49].

В цитохроме *bd* не обнаруживают меди, однако он содержит три редокс-активных гема:

низкоспиновый гем b_{558} и высокоспиновые гемы b_{595} и d [50, 51]. Гем b_{558} расположен на субъединице I, тогда как гемы b_{595} и d , вероятно, находятся в районе контакта субъединиц I и II [52]. Согласно современным представлениям, все три гема расположены ближе к внешней (периплазматической) стороне мембраны [53]. Гексакоординированный гем b_{558} , по-видимому, вовлечен в окисление хинола, в то время как гем d связывает молекулярный кислород, принимая непосредственное участие в его четырехэлектронном восстановлении до H_2O . Роль пентакоординированного гема b_{595} до сих пор остается невыясненной; некоторые авторы предположили, что его функция – быть посредником в переносе электрона между гемом b_{558} и гемом d [54, 55]. По мнению других исследователей гем b_{595} представляет собой второй редокс-центр, способный реагировать с кислородом [56, 57]. Наконец, на ферментах из *E. coli* и *A. vinelandii* получены данные, согласно которым гем b_{595} может участвовать в восстановлении кислорода, образуя вместе с гемом d двухгемовый кислородоредуктазный центр, напоминающий гем/Cu биядерный центр у гем-медных оксидаз [9, 58–68]. С другой стороны, в цитохроме *bd* из *Geobacillus thermodenitrificans* не выявляется значительного взаимодействия между гемами b_{595} и d в отличие от цитохрома *bd*-I из *E. coli* [69]. Это может отражать существенные различия между двумя ферментами в устройстве активного центра.

Общепринято, что в ходе каталитического цикла (рис. 1) цитохром *bd* претерпевает следующие переходы:



где A^1 и A^3 – оксигенированные формы восстановленного гема d в ферменте с одним ($b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{2+} - O_2$) и тремя ($b_{558}^{2+}b_{595}^{2+}d^{2+} - O_2$) электронами соответственно; 'P' – короткоживущее состояние, которое, как полагали изначально, является пероксоинтермедиатом гема d ; F – интермедиат с феррильной формой гема d ($b_{558}^{3+}b_{595}^{3+}d^{4+} = O^{2-}$), O^1 – одноэлектронная форма фермента с окисленным гемом d ($b_{558}^{2+}b_{595}^{3+}d^{3+} - OH$). В стационарных условиях преобладают формы фермента A^1 и F в качестве основных каталитических интермедиатов [70]. В связи с этим, данные интермедиаты обнаруживают в препаратах изолированного и мембраносвязанного фермента. В тех же условиях также регистрируется и небольшая фракция интермедиата O^1 [70]. A^3 и 'P' – короткоживущие соединения, которые при комнатной температуре можно увидеть только с помощью методов быстрой кинетики [10, 11]. О существовании промежуточного

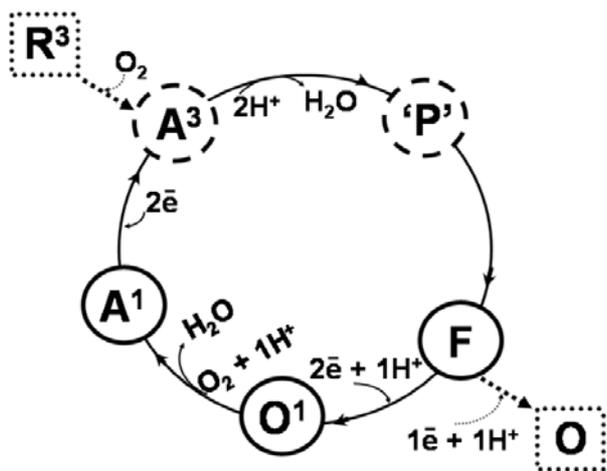


Рис. 1. Каталитический цикл цитохрома *bd*. Стрелки, изображенные сплошными линиями, показывают ход каталитической реакции. Пунктирные стрелки показывают переходы, которые не являются частью каталитического цикла

соединения 'P' впервые сообщили Белевич с соавт. [10]. Соединение 'P', возможно, представляет собой феррильный интермедиат, но с π -катион-радикалом на порфириновом кольце гема *d* и электроном на геме b_{558} ($b_{558}^{2+}b_{395}^{3+}d^{*4+} = O^{2-}$) [71]. Полностью окисленная (O, $b_{558}^{3+}b_{395}^{3+}d^{3+} - OH$) и полностью восстановленная (R^3 , $b_{558}^{2+}b_{395}^{2+}d^{2+}$) формы (рис. 1), скорее всего, не являются интермедиатами каталитического цикла [70–72], но могут быть получены искусственно. Стоит заметить, что феррильный комплекс цитохрома *d*, очень похожий по спектральным свойствам на истинный каталитический интермедиат F [10, 11], можно получить добавлением избытка перекиси водорода к ферменту, окисленному на воздухе либо обработанному липофильным окислителем [8, 73–75]. В последнем случае реакция с перекисью водорода происходит довольно быстро с наблюдаемой константой скорости второго порядка k , равной $600 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$ [74].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПЕРЕКИСЬЮ ВОДОРОДА (H_2O_2)

Большой объем данных свидетельствует о том, что цитохром *bd* вносит вклад в устойчивость бактерий к окислительному стрессу, вызываемому перекисью водорода. Мутанты *E. coli*, лишенные цитохрома *bd*, чрезвычайно чувствительны к H_2O_2 [33]. Соответственно, уровень экспрессии цитохрома *bd* у *E. coli* возрастает под воздействием перекиси [76]. Коршунов и Имлей

[77], используя штамм *E. coli*, лишенный некоторых антиоксидантных ферментов (катализаторы KatG и KatE и НАДН-пероксидазы Ahp), показали, что фермент типа *bd* понижает образование внутриклеточной H_2O_2 при внезапном переходе от анаэробных к аэробным условиям роста. Авторы предположили, что цитохром *bd* выполняет эту функцию опосредованно, забирая восстановительные эквиваленты у фумарат-редуктазы, ключевого генератора H_2O_2 [77].

Недавно мы обнаружили, что цитохром *bd*-I из *E. coli* способен также непосредственно утилизировать H_2O_2 [78, 79]. По всей вероятности, для этой цели фермент может задействовать два различных механизма, демонстрируя как каталазную [78], так и пероксидазную [79] активность. Высокая каталазная активность цитохрома *bd*-I была описана Борисовым с соавт. [78]. О ней судили полярографически, измеряя скорость образования O_2 при добавлении H_2O_2 к ферменту [78]. Активность наблюдалась как на изолированном солюбилизованном ферменте (рис. 2, а), так и на клетках штамма *E. coli* UM2, лишенного катализатора и сверхэкспрессирующего цитохром *bd*-I (сплошная кривая на рис. 2, б).

Реакцию H_2O_2 с изолированным ферментом изучали более подробно [78]. Оказалось, что оксидаза демонстрирует заметную каталазную активность не только в состоянии «окисленной на воздухе» (рис. 2, а), но и в ходе каталитической реакции с O_2 (в присутствии убихинола-1 и избытка дитиотреитола, служащих в качестве системы восстановления). Обнаружено, что в ходе каталитической реакции каталазная и кислород-редуктазная активности не конкурируют между собой, свидетельствуя о том, что за эти активности в ферменте ответственны разные активные центры. При истощении O_2 и последующем полном восстановлении фермента каталазная активность исчезает. Таким образом, эта активность зависит от редокс-состояния цитохрома *bd*-I.

Как и ожидалось, обнаружено, что скорость реакции возрастает пропорционально увеличению концентрации оксидазы, так же как и от концентрации H_2O_2 вплоть до 0,5 мМ. При более высоких концентрациях H_2O_2 скорость реакции стремится к насыщению, что может объясняться частичной инактивацией фермента. Показано, что продукт реакции (O_2) не тормозит каталазную активность фермента, поскольку почти одинаковые значения скорости были измерены в аэробных ($\sim 255 \text{ мкМ O}_2$) и микроаэробных (3–15 мкМ O_2) условиях. Реакция протекает с образованием $\sim 0,5 \text{ M O}_2$ на 1 М H_2O_2 , в то время как в контрольных опытах (т.е. с термоинактивированным ферментом, в отсутствие

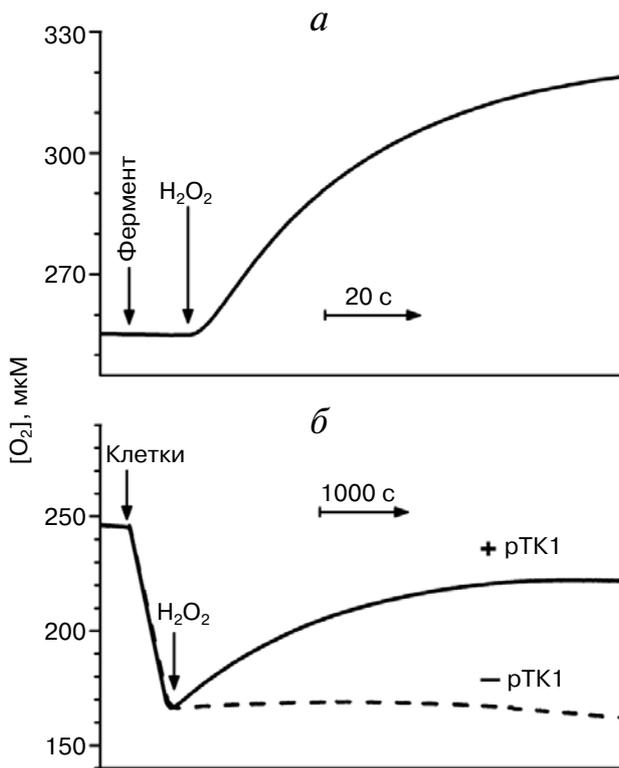


Рис. 2. Каталазная активность цитохрома *bd-I* из *E. coli*. *a* – К изолированному солюбилизованному ферменту добавлена 100 мкМ H_2O_2 ; *б* – к лишенным каталаз клеткам *E. coli* штамма UM2 (отсутствуют каталазы KatG и KatE) добавлена 235 мкМ H_2O_2 . Клетки, сверхэкспрессирующие цитохром *bd* (благодаря наличию плазмиды pTK1 с опероном, кодирующим цитохром *bd-I*), проявляют каталазную активность (сплошная кривая: + pTK1). В отсутствие суперэкспрессии цитохрома *bd-I* клетки не обнаруживают заметной каталазной активности (пунктирная кривая: – pTK1). Детали экспериментов представлены в работе Борисова с соавт. [78]

фермента или без субстрата) генерации O_2 не наблюдали.

Проведен ряд экспериментов с различными ингибиторами для получения представления о природе сайта, ответственного за наблюдаемую каталазную активность. Отсутствие действия *N*-этилмалеимида исключает участие тиоловых групп белка в каталазной реакции. Вовлеченность хинол-связывающего сайта также исключили, поскольку, как оказалось, реакция нечувствительна к антимицину А. Ингибиторы, нацеленные на восстановленный гем *d*, такие как NO и CO, также не влияли на каталазную активность, таким образом свидетельствуя против участия в реакции этого гема. Отсутствие эффектов NO, являющейся эффективным ингибитором природных каталаз [78, 80], позволило нам исключить объяснение наблюдаемой ката-

лазной активности наличием следовых количеств каталаз в препаратах цитохрома *bd*.

Молекулярный механизм, лежащий в основе каталазной активности цитохрома *bd*, пока неясен. Каталазная активность фермента на 3 порядка более чувствительна к цианиду, чем кислород-редуктазная [78], указывая на участие гемовой группы в каталазной активности. Поскольку кислород-редуктазная активность непосредственно связана с гемом *d*, и эта активность не конкурирует с каталазной реакцией, гем *d* не должен быть вовлечен в последнюю реакцию. На этом основании предварительно предположили, что сайт, ответственный за каталазную активность – высокоспиновый гем b_{595} [78]. Выяснено, что цианид в концентрации, полностью подавляющей каталазную активность, вызывает лишь незначительные изменения в спектре поглощения «окисленного на воздухе» фермента, что соответствует связыванию этого лиганда не более чем с 4% гемов *b*. Следовательно, в препаратах солюбилизованного цитохрома *bd-I* лишь небольшая фракция фермента наделена каталазной активностью (с кажущимся числом оборотов не менее 3250 с^{-1}) [78]. Важно подчеркнуть, что наблюдаемая каталазная активность – не артефакт процедуры выделения/очистки и не следствие примеси бактериальной природной каталазы, поскольку суперэкспрессированный цитохром *bd-I* проявляет заметную каталазную активность в интактных клетках, лишенных каталаз KatE и KatG (сплошная кривая на рис. 2, б). Таким образом, можно заключить, что у *E. coli*, в дополнение к бактериальным каталазам, цитохром *bd-I* обладает защитной ролью от окислительного стресса.

Было показано, что цитохром *bd-I* из *E. coli* также проявляет пероксидазную активность в присутствии разных субстратов, таких как гваякол, ферроцен, бензогидрохинон и ферроцианид калия [79]. Гваякол-пероксидазную активность исследовали более подробно. В частности, как оказалось, ингибиторы кислород-редуктазной активности фермента, среди которых цианид, пентахлорфенол, 2-*n*-гептил-4-гидроксихинолин-*N*-оксид, сходным образом тормозят пероксидазную активность цитохрома *bd-I* из *E. coli* [79]. Предполагается, что гваякол передает электроны цитохрому *bd-I* через сайт связывания хинола, а восстановление H_2O_2 осуществляется в кислород-редуктазном центре. Хотя пероксидазная активность солюбилизованного фермента по отношению к гваяколу оказалась довольно низкой (кажущееся число оборотов $\sim 4\text{ с}^{-1}$), подобная активность *in vivo*, т.е. с физиологическими донорами электронов (такими как хинолы), может быть гораздо выше, тем

самым внося вклад в детоксификацию H_2O_2 в бактериальной клетке.

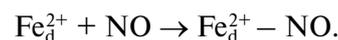
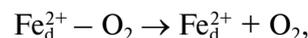
Молекулярный механизм, посредством которого регулируются пероксид-утилизирующие активности цитохрома *bd*-I в клетке *E. coli*, пока неизвестен; также неизвестно, наделены ли оксидазы типа *bd* из других патогенных бактерий такими активностями. В этой связи интересно отметить, что нарушение системы созревания цитохрома *c* в возбудителе туберкулеза *Mycobacterium tuberculosis*, как сообщалось, приводит к значительному повышению как экспрессии цитохрома *bd*, так и устойчивости бактерии к H_2O_2 [81]. Это наблюдение свидетельствует о том, что в *M. tuberculosis* оксидаза типа *bd* играет роль в защите патогена от окислительного стресса, метаболизируя H_2O_2 посредством каталазной и/или пероксидазной активности [82].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ОКИСЬЮ АЗОТА (NO)

NO продуцируется клеткой хозяина как часть иммунного ответа на микробные инфекции. Интересно, что в некоторых бактериях (*E. coli* [83], *Staphylococcus aureus* [84], *M. tuberculosis* [20], *Desulfovibrio gigas* [85], *Bacillus subtilis* [86]) NO индуцирует экспрессию генов, кодирующих цитохром *bd*. В этой связи изучение взаимодействия цитохрома *bd* с NO представляет особый интерес. Выяснено, что NO эффективно тормозит кислород-редуктазную активность *bd*-оксидазы из *E. coli* и *A. vinelandii* [87]. При $[NO] > 0,5$ мкМ достигается быстрое и полное ингибирование активности этих ферментов. Цитохром *bd*-I из *E. coli* исследовали более подробно. Обнаружили, что вслед за удалением из раствора добавленной (<1 мкМ) NO кислород-редуктазная активность фермента восстанавливается быстро и полностью [87]. Напротив, при более высоких (микромольных) концентрациях NO наблюдали незначительное (<15%) необратимое ингибирование фермента (рис. 3) [88]. Для цитохрома *bd*-I из *E. coli* при $[O_2] = 70$ мкМ величина кажущейся константы ингибирования (K_i) для NO составляет 100 нМ [87], что близко к значению K_i , полученному для митохондриальной цитохром *c* оксидазы в сходных экспериментальных условиях [89]. После увеличения концентрации O_2 в растворе (до 1 мМ) наблюдаемая величина K_i для NO оказалась значительно выше (230 нМ) [87]. Это наблюдение свидетельствует о конкуренции NO и O_2 за связывание с восстановленным гемом *d* без лиганда:



Поскольку константы скоростей связывания NO и O_2 с восстановленным гемом *d*, вероятнее всего, похожи [2], при низком соотношении $[NO]/[O_2]$ начальная фаза ингибирования, как ожидается, должна быть медленной. Однако это не так, поскольку фермент тормозится NO довольно быстро даже при $[NO]/[O_2] \sim 0,005$ [87]. Это, вероятно, объясняется тем, что NO может «отлавливать» не только восстановленный гем *d* без лиганда, но и некоторые каталитические интермедиаты фермента, которые инертны по отношению к молекулярному кислороду. Соответственно, недавно мы показали, что нереагирующие с O_2 интермедиаты A^1 и F, доминирующие в стационарных условиях [70], способны вступать в реакцию с NO [75, 90]. При взаимодействии с интермедиатом A^1 NO вытесняет кислород из гема *d*, образуя в конечном итоге нитрозильный комплекс с железом этого гема. В этой реакции скорость-лимитирующая стадия – диссоциация O_2 из гема *d* ($k = 78$ с⁻¹) [90]:



По-видимому, цитохром *bd* не наделен NO-редуктазной активностью (т.е. он не способен

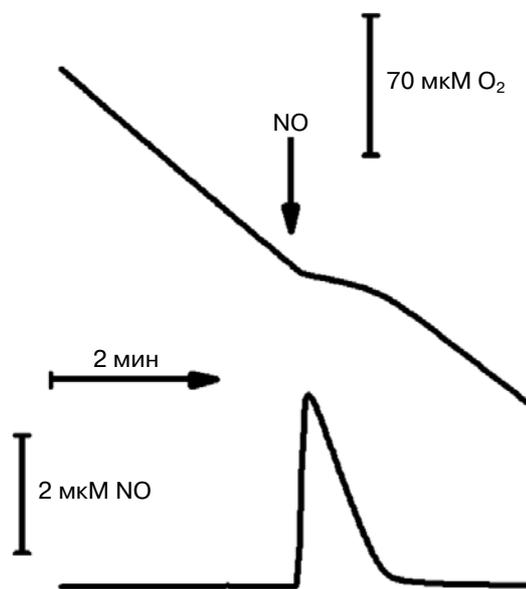


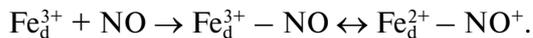
Рис. 3. Ингибирование окисью азота активности изолированного солюбилизованного цитохрома *bd*-I из *E. coli*. Кривые для O_2 и NO записаны параллельно. O_2 -редуктазная активность фермента поддерживалась восстанавливающими субстратами: 10 мМ аскорбатом с 0,5 мМ ТМФД. Добавленная NO – 4 мкМ, цитохром *bd*-I – 100 нМ. Детали экспериментов представлены в работе Борисова и соавт. [88]

восстанавливать NO до N₂O) [87]. Реакция окисления азота с интермедиатом F приводит к образованию комплекса полностью окисленного фермента с нитритом, который связан с окисленным гемом *d*. Эта реакция довольно быстрая ($k \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, данные получены для цитохрома *bd* из *A. vinelandii* [75]) и, вероятно, протекает по следующему механизму:



В этой реакции NO претерпевает окислительное разложение с образованием гораздо менее токсичного нитрита. Поэтому реакция может иметь физиологическое значение в качестве защитного механизма от NO.

Говоря о взаимодействии NO с разными формами цитохрома *bd*, стоит упомянуть, что этот лиганд также реагирует с гемом *d* в полностью окисленном ферменте с константой скорости $k \sim 10^2 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$, образуя нитрозильный аддукт гема *d* [91]:



Важно подчеркнуть, что после исчерпания NO в среде измерения восстановление активности цитохрома *bd-I* наступает намного быстрее, чем в случае митохондриальной цитохром *c* оксидазы [2, 87]. Происходит это потому, что в полностью восстановленном изолированном бактериальном ферменте NO диссоциирует из гема *d* с гораздо более высокой скоростью, чем из гема *a*₃ в митохондриальном ферменте ($k = 0,133 \text{ c}^{-1}$ [90] против $k = 0,0035 \text{ c}^{-1}$ [92]). Данные о высокой скорости диссоциации NO из цитохрома *bd-I* [90] также удалось подтвердить на интактных клетках *E. coli* [93]. Еще одно важное наблюдение, сделанное на изолированном цитохроме *bd-I*, состоит в том, что величина константы скорости диссоциации NO из полностью восстановленного фермента ($k = 0,133 \text{ c}^{-1}$) заметно выше, чем в случае одноэлектронной формы фермента ($k = 0,036 \text{ c}^{-1}$) [90]. Это свидетельствует о том, что редокс-состояние гемов *b* (скорее всего, гема *b*₅₉₅) влияет на стабильность нитрозильного комплекса восстановленного гема *d*, т.е. для максимально быстрой диссоциации NO требуется гем *b*₅₉₅ в восстановленном состоянии. Эта уникальная способность цитохрома *bd* к быстрой диссоциации NO из активного центра может объяснить, почему при определенных условиях преимущественно экспрессируется именно эта оксидаза взамен гем-медного фермента. Действительно, можно ожидать, что более быстрая диссоциация NO должна ускорять восстановление бактериального дыхания от ингибирования NO, тем самым наделяя микроорганизм

более высокой устойчивостью к нитрозилирующему стрессу. Интересно, что, как было недавно обнаружено, терминальная оксидаза типа *bd* из *Shewanella oneidensis* также наделяет этот грамотрицательный факультативный анаэроб большей устойчивостью к нитриту и NO в условиях аэробного роста [94, 95].

ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ С ПЕРОКСИНИТРИТОМ (ONOO⁻)

В ответ на бактериальную инфекцию клетки иммунной системы млекопитающих вырабатывают как окись азота (NO), так и супероксид-анион в высоких концентрациях за счет активации работы NO-синтаз и НАДФН-оксидазы соответственно. В результате последующей диффузионно-контролируемой реакции NO с супероксид-анионом образуется пероксинитрит (ONOO⁻). Пероксинитрит — высоко реакционноспособное токсичное соединение, которое приводит к возникновению как окислительного, так и нитрозилирующего стресса у бактерий [96]. Проникая внутрь бактериальной клетки, ONOO⁻ может вызывать модификации белков [97, 98], окисление липидов [99] и повреждение ДНК [100].

Как уже упоминалось выше, некоторые патогенные бактерии в процессе инфицирования хозяина экспрессируют цитохром *bd* в качестве терминальной оксидазы дыхательной цепи [6]. Поэтому важно знать: 1) степень чувствительности терминальной оксидазы типа *bd* к ONOO⁻ и 2) преимущества с точки зрения устойчивости к окислительному и нитрозилирующему стрессу, которые дает патогену экспрессия оксидазы *bd*-типа, а не гем-медной оксидазы, такой как цитохром *c* оксидаза. Ранее Купер с соавт. подробно изучили взаимодействие цитохром *c* оксидазы, выделенной из митохондрий, с ONOO⁻ и сообщили, что ONOO⁻ вызывает необратимое ингибирование очищенной цитохром *c* оксидазы [101–103].

Недавно мы исследовали влияние ONOO⁻ на кислород-редуктазную активность цитохрома *bd-I* из *E. coli* [88] и обнаружили, что при добавлении ONOO⁻ к изолированному солюбилизованному ферменту, находящемуся в реакции с O₂ (в присутствии избытка восстановителей аскорбата и ТМФД), наблюдаются два эффекта: временная остановка поглощения кислорода и образование NO (рис. 4, *a*). К примеру, при внесении 50 мкМ ONOO⁻ выделяется 4 мкМ NO. Как только NO исчезает из раствора из-за реакций с O₂ и феррильным комплексом цитохрома *bd-I*, активность потребления ферментом кислорода восстанавливается. Детальный ана-

лиз скоростей потребления кислорода, измеренных до и после добавления ONOO^- , показал, что если концентрация NO , образованной после добавления ONOO^- , больше 1 мкМ, ферментативная активность не возвращается к первоначальному уровню. Точно такие же результаты получили в контрольных экспериментах при добавлении аутентичной NO вместо ONOO^- (рис. 3). Последний результат свидетельствует о том, что это небольшое необратимое ингибирование, наблюдаемое после добавления высоких концентраций ONOO^- , происходит благодаря NO , а не ONOO^- . Максимальное необратимое ингибирование (~15%) наблюдали при 6 мкМ NO , добавленной извне либо образованной после добавления 100 мкМ ONOO^- [88]. Важно подчеркнуть, что при добавлении ONOO^- к клеткам *E. coli* с высоким содержанием цитохрома *bd-I* также регистрировали быстрое и обратимое торможение поглощения кислорода (рис. 4, б). Однако в этом случае, после добавления высоких концентраций ONOO^- к клеткам, степень необратимого ингибирования очень мала (<5%), в соответствии с наблюдением, что в этих экспериментальных условиях не образовывалось заметного количества NO (рис. 4, б). Это позволило нам заключить, что кислород-редуктазная активность цитохрома *bd-I*, изолированного или находящегося в клетках, не ингибируется ONOO^- как таковым [88]. Интересно заметить, что в обоих случаях (изолированный фермент или клетки) добавление ONOO^- приводит не только к временной остановке потребления кислорода, но и к краткосрочному образованию небольшого количества O_2 (см. нарастающий участок кривой для кислорода на рис. 4). Поскольку H_2O_2 может содержаться в качестве примеси в коммерческих препаратах ONOO^- и/или быть вторичным продуктом распада ONOO^- , мы полагаем, что наблюдаемая генерация O_2 — следствие каталазной активности цитохрома *bd-I*, нечувствительной к NO [78, 88].

Также мы провели прямое измерение пероксинитрит-детоксифицирующей активности изолированного цитохрома *bd-I* из *E. coli* с помощью спектрофотометрической установки для быстрого смешивания. В этих экспериментах регистрировали концентрацию ONOO^- во времени, измеряя поглощение при 310 нм. Также был проведен ряд контрольных экспериментов (без фермента или без восстанавливающих субстратов или без ONOO^-), результаты которых были использованы при расчете константы скорости ферментативного распада ONOO^- цитохромом *bd-I* в реакции с O_2 и избытком восстановителей аскорбата и ТМФД. Как и ожидалось, обнаружили, что эта наблюдаемая кон-

станта скорости линейно возрастает с увеличением концентрации фермента [88]. Более того, при увеличении концентрации ТМФД с 150 до 300 мкМ при каждой из исследованных концентраций цитохрома *bd-I* наблюдается более быстрый распад ONOO^- , что соответствует увеличению ка-

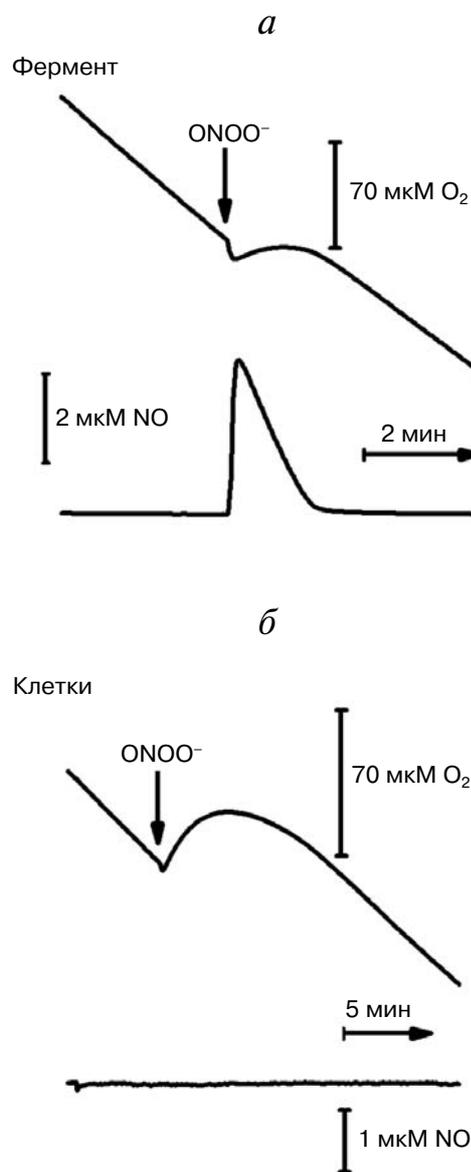


Рис. 4. Действие пероксинитрита на скорость потребления кислорода цитохромом *bd-I* из *E. coli*. *a* — ONOO^- (50 мкМ) добавляли к изолированному солубилизованному ферменту (100 нМ) по ходу реакции с O_2 и избытком восстановителей (10 мМ аскорбат и 0,5 мМ ТМФД); *б* — ONOO^- (80 мкМ) добавляли к дышащим (за счет эндогенных субстратов) клеткам *E. coli* (штамм GO105, лишенный цитохрома *bo₃*), сверхэкспрессирующим оксидазу *bd-I* (благодаря наличию плазмиды pTK1 с опероном, кодирующим этот фермент). Детали экспериментов представлены в работе Борисова и соавт. [88]

жушегося числа оборотов ONOO^- -детоксицирующей активности фермента, от 7 до 10 моль $\text{ONOO}^- \times (\text{моль фермента})^{-1} \times \text{с}^{-1}$ [88].

Таким образом, мы обнаружили, что: 1) в отличие от митохондриальной цитохром *c* оксидазы цитохром *bd-I* из *E. coli* не инактивируется ONOO^- вплоть до концентрации 100 мкМ; 2) фермент *bd-I*, находящийся в реакции с кислородом и восстанавливающими субстратами, способен довольно быстро метаболитизировать ONOO^- , выступая, таким образом, в качестве детоксификатора этого высоко реакционноспособного токсичного соединения. Насколько нам известно, это первый случай прямого измерения кинетики разложения ONOO^- терминальной оксидазой [88].

ФАРМАКОЛОГИЧЕСКИЕ ПРЕПАРАТЫ – СПЕЦИФИЧЕСКИЕ ИНГИБИТОРЫ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО МЕТАБОЛИЗМА ПАТОГЕННЫХ БАКТЕРИЙ

Для борьбы с патогенными микроорганизмами в течение многих десятилетий используется ряд антибиотиков с различными механизмами действия. Однако в последние годы наблюдается значительный рост устойчивости (в т.ч. множественной лекарственной устойчивости) патогенных микроорганизмов к противомикробным препаратам, прежде всего антибиотикам, которые в прошлом были очень эффективны. В результате инфекционные заболевания, вызываемые такими устойчивыми патогенами, не поддаются стандартному лечению, что приводит к затяжной болезни и повышенному риску смерти. Следовательно, возникает острая необходимость в разработке новых антимикробных лекарственных соединений с принципиально новыми механизмами действия. В этой связи ферменты, играющие центральную роль в энергетическом метаболизме, представляют собой подходящие мишени для новых антибактериальных соединений.

Одной из таких мишеней могла бы быть цитохром *bd* оксидаза. Как показано выше, этот фермент способен значительно повысить устойчивость микробной клетки к окислительному и нитрозилирующему стрессу, тем самым, вероятно, помогая бактериальному патогену преодолеть иммунную защиту хозяина. Поскольку цитохром *bd* обнаруживается только у бактерий, селективные ингибиторы оксидаз типа *bd* не должны оказывать негативного влияния на энергетический метаболизм хозяина.

Разработка лекарств нового поколения мировой фарминдустрией находится только на самом начальном этапе. Первым препаратом нового поколения, направленным на энергетический

метаболизм бактериального патогена, является бедаквилин (диарилхинолин). Бактерицидное действие этого противотуберкулезного средства, одобренного Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (U.S. Food and Drug Administration), обусловлено его способностью селективно ингибировать F_0F_1 -АТФ-синтазу у *Mycobacterium tuberculosis* [104]. Угнетение синтеза АТФ приводит к нарушению системы производства и, в конечном итоге, к гибели микробной клетки. Однако по сравнению с другими современными противотуберкулезными лекарствами, к примеру, изониазидом, бедаквилин убивает клетки *M. tuberculosis* довольно медленно [105]. Недавно мы выдвинули гипотезу, что цитохром *bd* мог бы наделять клетки *M. tuberculosis* более высокой устойчивостью к окислительному стрессу благодаря способности расщеплять перекись водорода [82]. Вслед за нашей работой Берни с соавт. [106] сообщили, что скорость, с которой бедаквилин убивает клетки *M. tuberculosis*, заметно возрастает, если провести нокаут терминальной оксидазы типа *bd* (путем замены гена *cydA* на гигромициновую кассету с помощью специализированной трансдукции). Это согласуется с тем наблюдением, что в клетках *M. tuberculosis*, обработанных бедаквилином, уровень экспрессии цитохрома *bd* существенно возрастает [105].

Другой лекарственный препарат, поражающий дыхательную цепь *M. tuberculosis*, – соединение Q203, в основе которого – имидазо[1,2- α]пиридин [107]. Его действие основано на ингибировании дыхательного комплекса *bc₁* [107]. Недавно было описано действие серии из пяти различных структурных основ («скаффолдов») производных имидазо[1,2- α]пиридина, на клинические штаммы *M. tuberculosis* [108]. Хотя имидазо[1,2- α]пиридины полностью подавляют рост большинства исследованных штаммов *M. tuberculosis* из-за торможения активности комплекса *bc₁*, лабораторно-адаптированные штаммы H37Rv, CDC1551 и Erdman, как оказалось, способны преодолеть это ингибирование роста [108]. Предположили, что это происходит благодаря повышению уровня экспрессии цитохрома *bd*. Действительно, удаление этой терминальной оксидазы в штамме H37Rv делает мутант более чувствительным к имидазо[1,2- α]пиридинам [108].

Суммируя вышеизложенное, можно надеяться, что использование специфического ингибитора цитохрома *bd* в сочетании с ингибиторами других ферментов энергетического метаболизма (например, бедаквилином и/или имидазо[1,2- α]пиридинами) будет иметь синергический эффект, тем самым представляя собой

инновационную фармакологическую стратегию борьбы с бактериальными патогенами.

Авторы признательны В.П. Скулачеву и А.А. Константинову за интерес к работе, полезное обсуждение и критические замечания.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (гранты 14-04-00153-а и 15-04-06266-а) и Министерства образования, университетов и исследований Италии (PNR-CNR Aging Program 2012–2014, FIRB RBIN06E9Z8 и PRIN 20107Z-8XBW_005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Poole, R.K., and Cook, G.M. (2000) Redundancy of aerobic respiratory chains in bacteria? Routes, reasons and regulation, *Adv. Microb. Physiol.*, **43**, 165–224.
- 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.
- Борисов В.Б. (1996) Цитохром *bd*: строение и свойства, *Биохимия*, **61**, 786–799.
- 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.
- Borisov, V.B., and Verkhovsky, M.I. (2009) Oxygen as acceptor. In *EcoSal Plus – Cellular and Molecular Biology of E. coli, Salmonella, and the Enterobacteriaceae*, DOI: 10.1128/ecosalplus.3.2.7 (<http://www.asmscience.org/content/journal/ecosalplus/10.1128/ecosalplus.3.2.7>) (Stewart, V., ed.), ASM Press, Washington, DC, pp. 1–31.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- 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.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., and Skulachev, V.P. (1997) Generation of protonic potential by the *bd*-type quinol oxidase of *Azotobacter vinelandii*, *FEBS Lett.*, **414**, 369–372.
- Kolonay, J.F., Jr, and Maier, R.J. (1997) Formation of pH and potential gradients by the reconstituted *Azotobacter vinelandii* cytochrome *bd* respiratory protection oxidase, *J. Bacteriol.*, **179**, 3813–3817.
- 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.
- Siletsky, S.A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase, *Front. Biosci.*, **18**, 36–57.
- 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.
- 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.
- Shi, L., Sohaskey, C.D., Kana, B.D., Dawes, S., North, R.J., Mizrahi, V., and Gennaro, M.L. (2005) Changes in energy metabolism of *Mycobacterium tuberculosis* in mouse lung and under *in vitro* conditions affecting aerobic respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 15629–15634.
- Juty, N.S., Moshiri, F., Merrick, M., Anthony, C., and Hill, S. (1997) The *Klebsiella pneumoniae* cytochrome *bd'* terminal oxidase complex and its role in microaerobic nitrogen fixation, *Microbiology*, **143**, 2673–2683.
- Way, S.S., Sallustio, S., Magliozzo, R.S., and Goldberg, M.B. (1999) Impact of either elevated or decreased levels of cytochrome *bd* expression on *Shigella flexneri* virulence, *J. Bacteriol.*, **181**, 1229–1237.
- Larsen, M.H., Kallipolitis, B.H., Christiansen, J.K., Olsen, J.E., and Ingmer, H. (2006) The response regulator ResD modulates virulence gene expression in response to carbohydrates in *Listeria monocytogenes*, *Mol. Microbiol.*, **61**, 1622–1635.
- Yamamoto, Y., Poyart, C., Trieu-Cuot, P., Lamberet, G., Gruss, A., and Gaudu, P. (2005) Respiration metabolism of Group B Streptococcus is activated by environmental haem and quinone and contributes to virulence, *Mol. Microbiol.*, **56**, 525–534.
- Endley, S., McMurray, D., and Ficht, T.A. (2001) Interruption of the *cydB* locus in *Brucella abortus* attenuates intracellular survival and virulence in the mouse model of infection, *J. Bacteriol.*, **183**, 2454–2462.
- Loisel-Meyer, S., Jimenez de Bagues, M.P., Kohler, S., Liautard, J.P., and Jubier-Maurin, V. (2005) Differential use of the two high-oxygen-affinity terminal oxidases of *Brucella suis* for *in vitro* and intramacrophagic multiplication, *Infect. Immun.*, **73**, 7768–7771.

27. Zhang-Barber, L., Turner, A.K., Martin, G., Frankel, G., Dougan, G., and Barrow, P.A. (1997) Influence of genes encoding proton-translocating enzymes on suppression of *Salmonella typhimurium* growth and colonization, *J. Bacteriol.*, **179**, 7186–7190.
28. Turner, A.K., Barber, L.Z., Wigley, P., Muhammad, S., Jones, M.A., Lovell, M.A., Hulme, S., and Barrow, P.A. (2003) Contribution of proton-translocating proteins to the virulence of *Salmonella enterica* serovars Typhimurium, Gallinarum, and Dublin in chickens and mice, *Infect. Immun.*, **71**, 3392–3401.
29. Baughn, A.D., and Malamy, M.H. (2004) The strict anaerobe *Bacteroides fragilis* grows in and benefits from nanomolar concentrations of oxygen, *Nature*, **427**, 441–444.
30. 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.
31. Avetisyan, A.V., Bogachev, A.V., Murtasina, R.A., and Skulachev, V.P. (1992) Involvement of a *d*-type oxidase in the Na⁺-motive respiratory chain of *Escherichia coli* growing under low $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ conditions, *FEBS Lett.*, **306**, 199–202.
32. Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Shestopalov, A.I., and Skulachev, V.P. (1995) Induction of the *Escherichia coli* cytochrome *d* by low $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ and by sodium ions, *Eur. J. Biochem.*, **232**, 304–308.
33. Wall, D., Delaney, J.M., Fayet, O., Lipinska, B., Yamamoto, T., and Georgopoulos, C. (1992) *arc*-dependent thermal regulation and extragenic suppression of the *Escherichia coli* cytochrome *d* operon, *J. Bacteriol.*, **174**, 6554–6562.
34. Poole, R.K., and Hill, S. (1997) Respiratory protection of nitrogenase activity in *Azotobacter vinelandii* – roles of the terminal oxidases, *Biosci. Rep.*, **17**, 307–317.
35. Берцова Ю.В., Демин О.В., Богачев А.В. (2005) Дыхательная защита нитрогеназного комплекса у *Azotobacter vinelandii*, *Успехи биологической химии*, **45**, 205–234.
36. Dincturk, H.B., Demir, V., and Aykanat, T. (2011) *Bd* oxidase homologue of photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochromatium vinosum* is co-transcribed with a nitrogen fixation related gene, *Antonie van Leeuwenhoek*, **99**, 211–220.
37. Hassani, B.K., Steunou, A.S., Liotenberg, S., Reiss-Husson, F., Astier, C., and Ouchane, S. (2010) Adaptation to oxygen: role of terminal oxidases in photosynthesis initiation in the purple photosynthetic bacterium, *Rubrivivax gelatinosus*, *J. Biol. Chem.*, **285**, 19891–19899.
38. 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.
39. 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.
40. van der Oost, J., deBoer, A.P.N., deGier, J.-W.L., Zumft, W.G., Stouthamer, A.H., and van Spanning, R.J.M. (1994) The heme-copper oxidase family consists of three distinct types of terminal oxidases and is related to nitric oxide reductase, *FEMS Microbiol. Lett.*, **121**, 1–10.
41. Green, G.N., Fang, H., Lin, R.-J., Newton, G., Mather, M., Georgiou, C.D., and Gennis, R.B. (1988) The nucleotide sequence of the *cyd* locus encoding the two subunits of the cytochrome *d*-terminal oxidase complex of *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **263**, 13138–13143.
42. 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.
43. 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.
44. Борисов В.Б., Смирнова И.А., Красносельская И.А., Константинов А.А. (1994) Оксигенированный цитохром *bd* из *Escherichia coli* может быть превращен в окисленную форму липофильными акцепторами электронов, *Биохимия*, **59**, 598–606.
45. Belevich, I., Borisov, V.B., Konstantinov, A.A., and Verkhovskiy, M.I. (2005) Oxygenated complex of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*: stability and photolability, *FEBS Lett.*, **579**, 4567–4570.
46. Belevich, I., Borisov, V.B., Bloch, D.A., Konstantinov, A.A., and Verkhovskiy, M.I. (2007) Cytochrome *bd* from *Azotobacter vinelandii*: evidence for high-affinity oxygen binding, *Biochemistry*, **46**, 11177–11184.
47. VanOrsdel, C.E., Bhatt, S., Allen, R.J., Brenner, E.P., Hobson, J.J., Jamil, A., Haynes, B.M., Genson, A.M., and Hemm, M.R. (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.
48. Hoerer, 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.
49. 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.
50. Lorence, R.M., Koland, J.G., and Gennis, R.B. (1986) Coulometric and spectroscopic analysis of the purified cytochrome *d* complex of *Escherichia coli*: evidence for the identification of «cytochrome *a*₁» as cytochrome *b*₅₉₅, *Biochemistry*, **25**, 2314–2321.
51. Miller, M.J., Hermodson, M., and Gennis, R.B. (1988) The active form of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli* is a heterodimer containing one copy of each of the two subunits, *J. Biol. Chem.*, **263**, 5235–5240.
52. Newton, G., and Gennis, R.B. (1991) *In vivo* assembly of the cytochrome *d* terminal oxidase complex of *Escherichia coli* from genes encoding the two subunits expressed on separate plasmids, *Biochim. Biophys. Acta*, **1089**, 8–12.
53. Zhang, J., Barquera, B., and Gennis, R.B. (2004) Gene fusions with beta-lactamase show that subunit I of the cytochrome *bd* quinol oxidase from *E. coli* has nine transmembrane helices with the O₂ reactive site near the periplasmic surface, *FEBS Lett.*, **561**, 58–62.
54. Poole, R.K., and Williams, H.D. (1987) Proposal that the function of the membrane-bound cytochrome *a*₁-like haemoprotein (cytochrome *b*-595) in *Escherichia coli* is a direct electron donation to cytochrome *d*, *FEBS Lett.*, **217**, 49–52.
55. Hata-Tanaka, A., Matsuura, K., Itoh, S., and Anraku, Y. (1987) Electron flow and heme-heme interaction between cytochromes *b*-558, *b*-595 and *d* in a terminal oxidase of *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta*, **893**, 289–295.
56. 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.

57. Rothery, R.A., Houston, A.M., and Ingledew, W.J. (1987) The respiratory chain of anaerobically grown *Escherichia coli*: reactions with nitrite and oxygen, *J. Gen. Microbiol.*, **133**, 3247–3255.
58. 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.
59. 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.
60. 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.
61. 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.
62. 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.
63. 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.
64. 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.
65. 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.
66. 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.
67. Siletsky, S.A., Zaspá, A.A., Poole, R.K., and Borisov, V.B. (2014) Microsecond time-resolved absorption spectroscopy used to study CO compounds of cytochrome *bd* from *Escherichia coli*, *PLoS One*, **9**, e95617.
68. Борисов В.Б. (2008) Взаимодействие хинолоксидазы типа *bd* из *Escherichia coli* и окиси углерода: гем *d* связывает СО с высоким средством, *Биохимия*, **73**, 18–28.
69. 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.
70. 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.
71. 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.
72. 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.
73. Борисов В.Б., Геннис Р.Б., Константинов А.А. (1995) Взаимодействие цитохрома *bd* из *Escherichia coli* с перекисью водорода, *Биохимия*, **60**, 315–327.
74. 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.
75. 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.
76. 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.
77. Korshunov, S., and Imlay, J.A. (2010) Two sources of endogenous hydrogen peroxide in *Escherichia coli*, *Mol. Microbiol.*, **75**, 1389–1401.
78. 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.
79. Борисов В.Б., Давлетшин А.И., Константинов А.А. (2010) Пероксидазная активность цитохрома *bd* из *Escherichia coli*, *Биохимия*, **75**, 520–530.
80. Brown, G.C. (1995) Reversible binding and inhibition of catalase by nitric oxide, *Eur. J. Biochem.*, **232**, 188–191.
81. Small, J.L., Park, S.W., Kana, B.D., Ioerger, T.R., Sacchettini, J.C., and Ehrt, S. (2013) Perturbation of cytochrome *c* maturation reveals adaptability of the respiratory chain in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e00475–00413.
82. Forte, E., Borisov, V.B., Davletshin, A., Mastronicola, D., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2013) Cytochrome *bd* oxidase and hydrogen peroxide resistance in *Mycobacterium tuberculosis*, *MBio*, **4**, e01006–01013.
83. Pullan, S.T., Gidley, M.D., Jones, R.A., Barrett, J., Stevanin, T.M., Read, R.C., Green, J., and Poole, R.K. (2007) Nitric oxide in chemostat-cultured *Escherichia coli* is sensed by Fnr and other global regulators: unaltered methionine biosynthesis indicates lack of S nitrosation, *J. Bacteriol.*, **189**, 1845–1855.
84. Richardson, A.R., Dunman, P.M., and Fang, F.C. (2006) The nitrosative stress response of *Staphylococcus aureus* is required for resistance to innate immunity, *Mol. Microbiol.*, **61**, 927–939.
85. Machado, P., Felix, R., Rodrigues, R., Oliveira, S., and Rodrigues-Pousada, C. (2006) Characterization and expression analysis of the cytochrome *bd* oxidase operon from *Desulfovibrio gigas*, *Curr. Microbiol.*, **52**, 274–281.
86. Moore, C.M., Nakano, M.M., Wang, T., Ye, R.W., and Helmann, J.D. (2004) Response of *Bacillus subtilis* to nitric oxide and the nitrosating agent sodium nitroprusside, *J. Bacteriol.*, **186**, 4655–4664.
87. 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.
88. Borisov, V.B., Forte, E., Siletsky, S.A., Sarti, P., and Giuffrè, A. (2015) Cytochrome *bd* from *Escherichia coli* catalyzes peroxyxynitrite decomposition, *Biochim. Biophys. Acta*, **1847**, 182–188.
89. Mason, M.G., Nicholls, P., Wilson, M.T., and Cooper, C.E. (2006) Nitric oxide inhibition of respiration involves both competitive (heme) and noncompetitive (copper) binding

- to cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 708–713.
90. 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.
 91. 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.
 92. Sarti, P., Giuffre, A., Forte, E., Mastronicola, D., Barone, M.C., and Brunori, M. (2000) Nitric oxide and cytochrome *c* oxidase: mechanisms of inhibition and NO degradation, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **274**, 183–187.
 93. 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*, *Nature Chem. Biol.*, **5**, 94–96.
 94. Fu, H., Chen, H., Wang, J., Zhou, G., Zhang, H., Zhang, L., and Gao, H. (2013) Crp-dependent cytochrome *bd* oxidase confers nitrite resistance to *Shewanella oneidensis*, *Environ. Microbiol.*, **15**, 2198–2212.
 95. Zhang, H., Fu, H., Wang, J., Sun, L., Jiang, Y., Zhang, L., and Gao, H. (2013) Impacts of nitrate and nitrite on physiology of *Shewanella oneidensis*, *PLoS One*, **8**, e62629.
 96. Ferrer-Sueta, G., and Radi, R. (2009) Chemical biology of peroxynitrite: kinetics, diffusion, and radicals, *ACS Chem. Biol.*, **4**, 161–177.
 97. McLean, S., Bowman, L.A., Sanguinetti, G., Read, R.C., and Poole, R.K. (2010) Peroxynitrite toxicity in *Escherichia coli* K12 elicits expression of oxidative stress responses and protein nitration and nitrosylation, *J. Biol. Chem.*, **285**, 20724–20731.
 98. Lindemann, C., Lupilova, N., Muller, A., Warscheid, B., Meyer, H.E., Kuhlmann, K., Eisenacher, M., and Leichert, L.I. (2013) Redox proteomics uncovers peroxynitrite-sensitive proteins that help *Escherichia coli* to overcome nitrosative stress, *J. Biol. Chem.*, **288**, 19698–19714.
 99. Rubbo, H., Trostchansky, A., and O'Donnell, V.B. (2009) Peroxynitrite-mediated lipid oxidation and nitration: mechanisms and consequences, *Arch. Biochem. Biophys.*, **484**, 167–172.
 100. Salgo, M.G., Bermudez, E., Squadrito, G.L., and Pryor, W.A. (1995) Peroxynitrite causes DNA damage and oxidation of thiols in rat thymocytes [corrected], *Arch. Biochem. Biophys.*, **322**, 500–505.
 101. Sharpe, M.A., and Cooper, C.E. (1998) Interaction of peroxynitrite with mitochondrial cytochrome oxidase. Catalytic production of nitric oxide and irreversible inhibition of enzyme activity, *J. Biol. Chem.*, **273**, 30961–30972.
 102. Cooper, C.E., and Davies, N.A. (2000) Effects of nitric oxide and peroxynitrite on the cytochrome oxidase K_m for oxygen: implications for mitochondrial pathology, *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 390–396.
 103. Cooper, C.E., Davies, N.A., Psychoulis, M., Canevari, L., Bates, T.E., Dobbie, M.S., Casley, C.S., and Sharpe, M.A. (2003) Nitric oxide and peroxynitrite cause irreversible increases in the K_m for oxygen of mitochondrial cytochrome oxidase: *in vitro* and *in vivo* studies, *Biochim. Biophys. Acta*, **1607**, 27–34.
 104. Andries, K., Verhasselt, P., Guillemont, J., Gohlmann, H.W., Neefs, J.M., Winkler, H., Van Gestel, J., Timmerman, P., Zhu, M., Lee, E., Williams, P., de Chaffoy, D., Huitric, E., Hoffner, S., Cambau, E., Truffot-Pernot, C., Lounis, N., and Jarlier, V. (2005) A diarylquinoline drug active on the ATP synthase of *Mycobacterium tuberculosis*, *Science*, **307**, 223–227.
 105. Koul, A., Vranckx, L., Dhar, N., Gohlmann, H.W., Ozdemir, E., Neefs, J.M., Schulz, M., Lu, P., Mortz, E., McKinney, J.D., Andries, K., and Bald, D. (2014) Delayed bactericidal response of *Mycobacterium tuberculosis* to bedaquiline involves remodelling of bacterial metabolism, *Nature Commun.*, **5**, 3369.
 106. Berney, M., Hartman, T.E., and Jacobs, W.R., Jr. (2014) A *Mycobacterium tuberculosis* cytochrome *bd* oxidase mutant is hypersensitive to bedaquiline, *MBio*, **5**, e01275–01214.
 107. Pethe, K., Bifani, P., Jang, J., Kang, S., Park, S., Ahn, S., Jiricek, J., Jung, J., Jeon, H.K., Cechetto, J., Christophe, T., Lee, H., Kempf, M., Jackson, M., Lenaerts, A.J., Pham, H., Jones, V., Seo, M.J., Kim, Y.M., Seo, M., Seo, J.J., Park, D., Ko, Y., Choi, I., Kim, R., Kim, S.Y., Lim, S., Yim, S.A., Nam, J., Kang, H., Kwon, H., Oh, C.T., Cho, Y., Jang, Y., Kim, J., Chua, A., Tan, B.H., Nanjundappa, M.B., Rao, S.P., Barnes, W.S., Wintjens, R., Walker, J.R., Alonso, S., Lee, S., Kim, J., Oh, S., Oh, T., Nehrbass, U., Han, S.J., No, Z., Lee, J., Brodin, P., Cho, S.N., Nam, K., and Kim, J. (2013) Discovery of Q203, a potent clinical candidate for the treatment of tuberculosis, *Nature Med.*, **19**, 1157–1160.
 108. Arora, K., Ochoa-Montano, B., Tsang, P.S., Blundell, T.L., Dawes, S.S., Mizrahi, V., Bayliss, T., Mackenzie, C.J., Cleghorn, L.A., Ray, P.C., Wyatt, P.G., Uh, E., Lee, J., Barry, C.E., 3rd, and Boshoff, H.I. (2014) Respiratory flexibility in response to inhibition of cytochrome *c* oxidase in *Mycobacterium tuberculosis*, *Antimicrob. Agents Chemother.*, **58**, 6962–6965.

**CYTOCHROME *bd* PROTECTS BACTERIA
AGAINST OXIDATIVE AND NITROSATIVE STRESS:
A POTENTIAL TARGET FOR NEXT-GENERATION
ANTIMICROBIAL AGENTS**

**V. B. Borisov^{1*}, E. Forte², S. A. Siletsky¹, M. Arese²,
A. I. Davletshin^{1,3}, P. Sarti^{2,4}, A. Giuffre⁴**

¹ *Lomonosov Moscow State University, Belozersky Institute
of Physico-Chemical Biology, Moscow 119991, Russia;
fax: +7(495)939-3181, E-mail: bor@genebee.msu.su*

² *Sapienza University of Rome, Department of Biochemical Sciences
and Istituto Pasteur – Fondazione Cenci Bolognetti,
Rome I-00185, Italy*

³ *State University for the Humanities, Institute of Oriental
and Classical Studies, Russian Moscow 125993, Russia*

⁴ *CNR Institute of Molecular Biology and Pathology,
Rome I-00185, Italy*

Received December 22, 2014

Revision received January 23, 2015

Cytochrome *bd* is a terminal quinol oxidase of the bacterial respiratory chain. This tri-heme integral membrane protein generates a proton motive force at lower efficiency compared to heme-copper oxidases. This notwithstanding, under unfavorable growth conditions bacteria often use cytochrome *bd* in place of heme-copper enzymes as the main terminal oxidase. This is the case for several pathogenic and opportunistic bacteria during host colonization. This review summarizes recent data on the contribution of cytochrome *bd* to bacterial resistance to hydrogen peroxide, nitric oxide, and peroxynitrite, harmful species produced by the host as part of the immune response to microbial infections. Growing evidence supports the hypothesis that *bd*-type oxidases contribute to bacterial virulence by promoting microbial survival under oxidative and nitrosative stress conditions. For these reasons, cytochrome *bd* represents a protein target for the development of next-generation antimicrobials.

Key words: oxidative stress, nitrosative stress, reactive oxygen and nitrogen species, respiratory chain, terminal oxidase, bacteria, virulence, antimicrobial agents