

ИССЛЕДОВАНИЕ МЕХАНИЗМА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ГЕМ-МЕДНЫМИ ДЫХАТЕЛЬНЫМИ ОКСИДАЗАМИ В РЕЖИМЕ РЕАЛЬНОГО ВРЕМЕНИ

Обзор

© 2023 С.А. Силецкий

*Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
119991 Москва, Россия; электронная почта: siletsky@belozersky.msu.ru*

Поступила в редакцию 29.06.2023

После доработки 15.08.2023

Принята к публикации 15.08.2023

Гем-медные дыхательные оксидазы являются высокоэффективными молекулярными машинами. Эти мембранные ферменты катализируют конечный этап клеточного дыхания эукариот и многих прокариот: перенос электронов от цитохромов или хинолов к молекулярному кислороду и восстановление O_2 до воды. Высвобождаемая в этой окислительно-восстановительной реакции свободная энергия преобразуется гем-медными дыхательными оксидазами в трансмембранный градиент электрохимического потенциала ионов водорода ($\Delta\mu H^+$). Гем-медные дыхательные оксидазы обладают уникальным механизмом генерации $\Delta\mu H^+$ — редокс-сопряженной протонной помпой. Использование в исследовании гем-медных оксидаз комбинации прямого электрометрического метода измерения кинетики генерации мембранного потенциала с подходами и методами стационарной кинетики и направленного мутагенеза позволяет получать уникальную информацию о перемещении протонов внутри белка в режиме реального времени. В обзоре суммированы результаты применения разрешенной во времени электрометрии к расшифровке механизмов работы этих важнейших биоэнергетических ферментов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: биоэнергетика, цитохромоксидаза, протеолипосомы, электрогенный, перенос протонов, генерация $\Delta\psi$, протонный насос, фотовосстановление, цитохром *aaz*, кинетика, прямой электрометрический метод, емкостная потенциометрия, временное разрешение, ионы цинка.

DOI: 10.31857/S0320972523100081, EDN: OTDXSA

ВВЕДЕНИЕ. ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕМ-МЕДНЫХ ДЫХАТЕЛЬНЫХ ОКСИДАЗ

Терминальные дыхательные оксидазы представляют собой ключевой компонент дыхательной цепи митохондрий и большинства аэробных бактерий [1, 2]. Будучи распространены повсеместно, эти ферменты располагаются в конце дыхательной цепи и катализируют восстановление молекулярного кислорода цитохромом *c* или убихинолом, сопряженно с образованием протон-движущей силы — трансмембранного градиента электрохимического

потенциала ионов водорода ($\Delta\mu H^+$) [3–7]. Образующийся $\Delta\mu H^+$ используется в клетках в дальнейшем в качестве источника энергии для энергопотребляющих процессов: биохимического синтеза, мембранного транспорта, механического движения бактериальных клеток и т.д.

Терминальные дыхательные оксидазы принято делить на две основные подгруппы: надсемейство гем-медных оксидаз и надсемейство цитохромов *bd* [7]. Характерной чертой гем-медных оксидаз является кислород-восстанавливающий каталитический центр, который образован близко расположенными

Принятые сокращения: ЦО — цитохромоксидаза; BNC — биядерный центр; F, O, O_n , P, E, E_n , R — состояния цитохром *c* оксидазы; *P*- и *N*-стороны мембраны — положительно и отрицательно заряженные водные фазы, разделенные сопрягающей мембраной; PLS — сайт загрузки протонов; Rubru — трис-бипиридилный комплекс рутения; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность электрических потенциалов; $\Delta\mu H^+$ — трансмембранный градиент электрохимического потенциала ионов водорода.

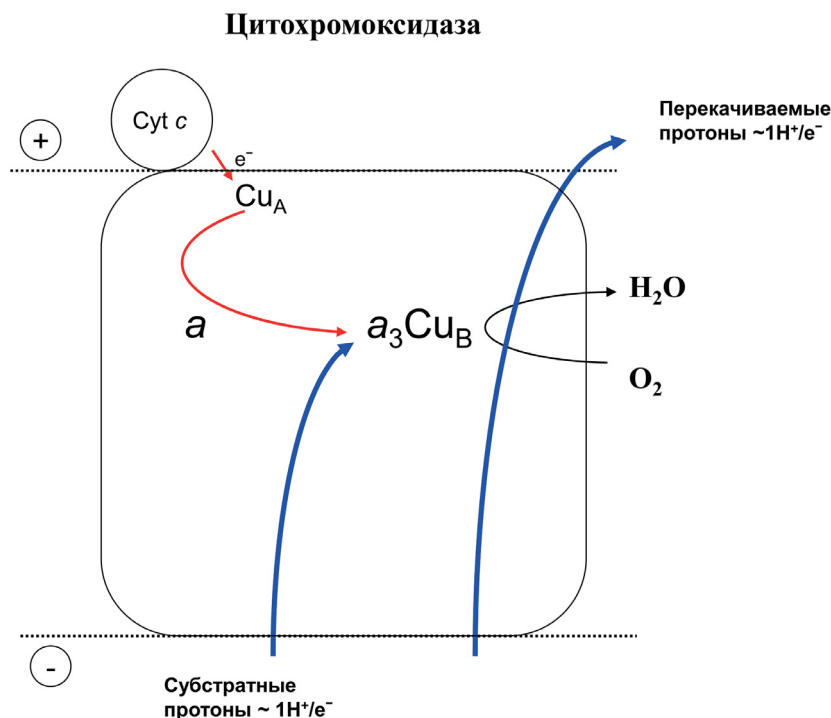


Рис. 1. Общая схема функционирования цитохромоксидазы. Отрицательно и положительно заряженные стороны мембраны обращены в матрикс митохондрий и в межмембранное пространство соответственно. В случае прокариотического фермента соответствующие стороны мембраны обращены в цитоплазму и в периплазматическое пространство. Красными и синими стрелками обозначены перенос электронов и протонов соответственно

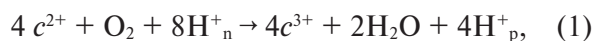
ионом железа гемовой группы и ионом меди (так называемый биядерный или бинуклеарный центр, BNC). Цитохромоксидаза (ЦО) из митохондрий содержит четыре редокс-центра (рис. 1). Каталитический центр в гидрофобном ядре ЦО состоит из двух редокс-центров: высокоспинового железа гема a_3 и иона меди Cu_B . Через 2 других редокс-центра (Cu_A и низкоспиновый гем a) в BNC последовательно поступают 4 электрона от четырех молекул цитохрома c , что приводит в итоге к восстановлению одной молекулы кислорода до двух молекул воды. В бактериальных ЦО низкоспиновый гем a может заменяться гемом b -типа, а вместо высокоспинового гема a_3 могут быть гемы o_3 - или b_3 -типа. Некоторые бактериальные оксидазы могут иметь дополнительные гемовые центры c -типа.

В надсемействе гем-медных оксидаз принято выделять 3 большие группы: семейства А, В и С [8]. Помимо них, сравнительный анализ геномов и структурное моделирование позволили идентифицировать гены 5 новых (D, E, F, G и H) семейств терминальных оксидаз, встречающихся в археобактериях [5]. К семейству А относится наиболее представительная и наиболее изучаемая группа ферментов, включающая такие модельные объекты, как цитохромоксидазы из митохондрий сердеч-

ной мышцы быка и дрожжей, оксидазы aa_3 из *Paracoccus denitrificans* и *Rhodobacter sphaeroides*, оксидаза caa_3 из *Thermus thermophilus*, а также хинол-оксидаза bo -типа из *Escherichia coli* [9–17]. Типичным представителем значительно менее изученного семейства В является цитохромоксидаза ba_3 из *T. thermophilus*, имеющая низкую гомологию аминокислотной последовательности с представителями семейства А [18, 19]. Наиболее удаленное, с эволюционной точки зрения, семейство С составляют представители оксидаз cbb_3 из различных организмов [20, 21].

Цитохромоксидаза генерирует протон-движущую силу вследствие векторной (т.е. направленной поперек мембраны) организации доставки электронов и протонов, необходимых для протекания каталитической реакции восстановления кислорода до воды, в BNC. При этом так называемые «химические» (или субстратные) протоны переносятся в BNC из внутренней водной фазы (с отрицательно заряженной N -стороны мембраны), в то время как электроны переносятся туда же от цитохрома c с внешней (положительно) стороны мембраны (P -сторона) (рис. 1; [22]). Кроме этого, ЦО дополнительно переносит с N -стороны на P -сторону мембраны в среднем 4 протона («помпируемые» или перекачиваемые

мые протоны) на каждую восстановленную молекулу кислорода, т.е. является протонной помпой [23, 24]. Таким образом, катализируемая ЦО химическая реакция сопряжена с разделением зарядов, соответствующим направленному трансмембранному переносу 8 зарядов на каждую восстановленную молекулу кислорода. Полная реакция, катализируемая цитохромоксидазой, может быть описана уравнением (1):



где n — внутримитохондриальное пространство; p — межмембранное пространство.

Генерация мембранного потенциала встроенной в протеолипосомы ЦО митохондрий в стационарном режиме (т.е. в режиме многократных оборотов фермента) была продемонстрирована в лаборатории Л.А. Драчева на заре развития прямого электрометрического метода [25]. Однако эти эксперименты не могли раскрыть электрогенный механизм генерации мембранного потенциала и формирования $\Delta\mu H^+$ в ходе каталитического цикла фермента. Развитие прямого электрометрического метода с адекватным временным разрешением для изучения событий внутри каталитического цикла фотоактивных белков [26] было позднее успешно применено к изучению механизмов работы гем-медных оксидаз. Поскольку гем-медные оксидазы не относятся к фотоактивируемым белкам, для изучения их электрогенных механизмов с высоким временным разрешением были разработаны и использованы методические подходы (см. далее), основанные на комбинации прямого электрометрического метода и специальных фотоактивируемых химических реакций для запуска реакции переноса электронов и протонов в ЦО с помощью наносекундных импульсов лазерного света. Это позволяет получать уникальную информацию об устройстве и работе редокс-зависимого протонного насоса ЦО, механизме сопряжения, об этапах перемещения протонов внутри белка в режиме реального времени (предстационарном режиме) [27–31].

ТРЕХМЕРНАЯ СТРУКТУРА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

С помощью рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная кристаллическая структура нескольких типичных представителей семейства А гем-медных терминальных оксидаз. Это ЦО из митохондрий

сердечной мышцы быка [32–35], бактериальные ЦО *aa*₃-типа из *P. denitrificans* [36–38] и *R. sphaeroides* [39, 40], хинол-оксидаза *bo*₃ из *E. coli* [41] и ЦО *caa*₃ из *T. thermophiles* [42]. Кроме того, атомная структура была получена для представителей семейств В и С, цитохрома *ba*₃ из *T. thermophilus* [19, 43] и *cbb*₃ из *Pseudomonas shutzeri* [21] соответственно.

Для гем-медных оксидаз характерно наличие центральной самой крупной субъединицы I, построенной из 12 пересекающих мембрану α -спиральных столбов. В то время как бактериальные ЦО содержат не более 4-х субъединиц, цитохромоксидаза из митохондрий млекопитающих состоит из 13 субъединиц и имеет примерно вдвое большую молекулярную массу (~200 кДа). Три наибольшие субъединицы ЦО митохондрий кодируются митохондриальным геномом, образуют каталитическое ядро фермента и гомологичны трем основным субъединицам, встречающимся в большинстве типичных прокариотических ЦО *aa*₃-типа семейства А надсемейства гем-медных терминальных оксидаз.

В структурах всех ЦО семейства А выявлены 2 потенциальных протон-проводящих пути из внутренней водной фазы в направлении к BNC, включающие в себя консервативные протон-обменивающие аминокислотные остатки и молекулы связанной воды [19, 32, 36, 39, 42]. Протон-проводящий путь D (D-канал [30–32]) ведет от остатка D132 через цепочку связанных водородными связями молекул воды и аминокислотных остатков к консервативному аминокислотному остатку E286, располагающемуся на расстоянии 10–12 Å от BNC и 24–26 Å — от остатка D132 [24–26]. Молекулы воды в канале стабилизированы посредством водородных связей с рядом высококонсервативных гидрофильных аминокислотных остатков: N139, N121, N207, S142, S200, S201 и S197 [33]. Протон-проводящий путь K (K-канал [44–46]) расположен непосредственно под BNC и ведет от поверхности белка с N-стороны мембраны через остатки T352, T359, K362 и связанную воду к остатку Y288 вблизи BNC. В формировании входа в K-канал участвует остаток E101 второй субъединицы I [38, 47]. Цепочка водородных связей прерывается на пути между остатками K362 и T359. Предполагается, что изменение конформации остатка K362 замыкает цепочки водородных связей, обеспечивая контролируемое проведение протона [38, 48].

Над гемовыми группами и Si_b располагается гидрофильный домен, через который теоретически может происходить выход

перекачиваемого протона в водную фазу с внешней стороны мембраны [49]. Этот домен включает в себя кластер отрицательно заряженных групп белка (в том числе консервативные остатки D399 и D404), несколько остатков аргинина, пропионатные заместители гемов, молекулы воды и связанный редокс-неактивный атом металла (ион Mg^{2+} — в ЦО митохондрий, частично замещаемый ионом Mn^{2+} — в ЦО прокариот) [38]. Путь переноса молекулярного кислорода в BNC организован посредством нескольких гидрофобных каналов в срединной части мембранного бислоя по направлению к активному центру [32, 39, 50, 51]. Выход на *P*-сторону мембраны молекул воды, образующихся в биядерном каталитическом центре, происходит, по-видимому, над гемовыми группами в области контакта субъединиц I и II, вблизи Mg^{2+}/Mn^{2+} сайта [52].

ИНТЕРМЕДИАТЫ КАТАЛИТИЧЕСКОГО ЦИКЛА ЦИТОХРОМОКСИДАЗЫ

Каталитический цикл ЦО семейства А может быть описан двумя фазами реакции: окислительной и восстановительной полуреакциями (рис. 2), каждая из которых включает в себя по 2 одноэлектронных перехода [53]. В ходе восстановительной фазы (переходы $O \rightarrow E$ и $E \rightarrow R$) первые 2 электрона переносятся в BNC, в результате чего он приобретает способность связывать молекулярный кислород. Окислительная фаза начинается с взаимодействия восстановленного BNC (состояние R; рис. 2) с молекулой кислорода с образованием первичного двухатомного кислородного аддукта (состояние A; не показано на рис. 2) [54]. Молекула кислорода переносится через Si_B к центральному атому железа высокоспинового гема a_3 с образованием оксикомплекса [55], представляющего собой смесь состояний: $Fe^{2+}-O_2$ и $Fe^{3+}-O_2^-$ [56]. На следующей стадии происходит разрыв межатомной $O-O$ связи и образование состояния R_M (рис. 2). Образование R_M требует переноса на O_2 четырех электронов из активного центра и по крайней мере одного протона [57, 58]. Два электрона поступают при окислении иона Fe^{2+} гема a_3 до оксоферрильного состояния $Fe^{4+}=O^{2-}$. Один электрон поступает от Si_B^{2+} , окисляющейся до Si_B^{2+} . Четвертый электрон и протон поступают от близко расположенного консервативного остатка Y288 [59], образующего ковалентную связь с гистидиновым лигандом Si_B [33, 60, 61]. Отдавая электрон и протон, остаток тирозина образует радикальную форму [62].

После образования интермедиата R_M , одноэлектронное восстановление R_M переводит ЦО в состояние F (перенос третьего электрона в каталитическом цикле на тирозин Y288). Окисление четвертой молекулы цитохрома c и перенос четвертого электрона в BNC завершает каталитический цикл с образованием полностью окисленного состояния O_H (рис. 2). При отсутствии доноров электронов окисленное «неотрелаксированное» состояние O_H в течение нескольких секунд спонтанно превращается в окисленное стабильное состояние (O). Состояния O и O_H отличаются между собой сродством к электрону соответствующих редокс-центров фермента, а также способностью к трансмембранной перекачке протонов [11, 29, 63–66]. Путем специфической обработки перекисью водорода или окисью углерода практически вся популяция фермента может быть переведена в стационарное состояние R_M или F, которые соответствуют в каталитическом цикле ЦО частичному восстановлению молекулярного кислорода в BNC двумя или тремя электронами.

ПОДХОДЫ К ИЗУЧЕНИЮ ПЕРЕНОСА ЗАРЯДОВ В ЦИТОХРОМОКСИДАЗЕ С ВРЕМЕННЫМ РАЗРЕШЕНИЕМ

В ходе измерений прямым электрометрическим методом протеолипосомы с изучаемым белком прикрепляют к искусственной макроscopicкой мембране (коллодиевая пленка, пропитанная раствором фосфолипидов в декане) и регистрируют кинетику генерации трансмембранного потенциала с помощью хлор-серебряных макроscopicких электродов с субмикросекундным временным разрешением. Трансмембранная разность электрических потенциалов ($\Delta\Psi$) на измеряемой макроscopicкой мембране нарастает пропорционально генерации разности электрических потенциалов на мембране протеолипосом, что позволяет отслеживать кинетику электрогенной транслокации зарядов в изучаемом белке с адекватным временным разрешением в предстационарном режиме [26, 67, 68].

Каталитический цикл ЦО происходит в миллисекундном временном диапазоне и включает в себя последовательность промежуточных состояний кислород-редуктазного биядерного центра и наборов отдельных стадий переноса электронов и протонов внутри переходов между промежуточными состояниями BNC. Все эти реакции происходят быстрее временного разрешения методов быстрого

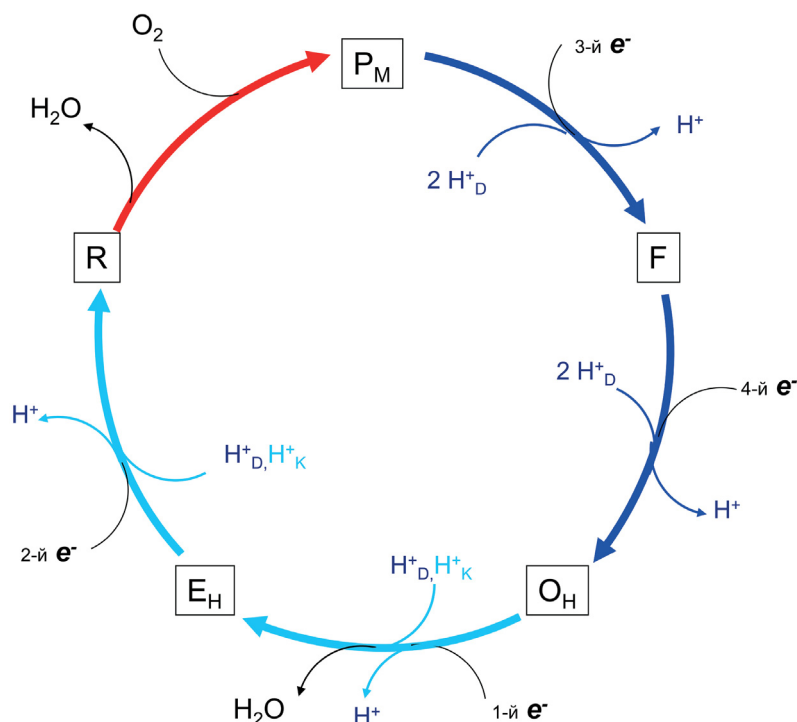


Рис. 2. Схема каталитического цикла цитохромоксидазы семейства А. Переходы от состояния R к O_H образуют окислительную фазу, в то время как переходы от O_H к R — восстановительную фазу каталитического цикла. В переходе $R \rightarrow P_M$ (красная стрелка) происходит связывание молекулы O_2 с гемом a_3 BNC в полностью восстановленном состоянии $Fe^{2+} Cu_B^{1+}$, разрыв межатомной $O-O$ связи и образование оксоферрильного комплекса гема $a_3 Fe^{4+}=O^{2-}$ и $Cu_B^{1+}-OH^-$. В переходах $P_M \rightarrow F$, $F \rightarrow O_H$, $O_H \rightarrow E_H$, $E_H \rightarrow R$ (синие и сине-зеленые стрелки) происходит последовательный перенос 4-х электронов в BNC ЦО и перекачивание протонов

смешивания. При исследовании каталитического цикла ЦО с временным разрешением для синхронизации всего ансамбля молекул фермента (одновременного запуска реакции переноса электронов внутри всей популяции фермента) используются реакции окисления либо восстановления ЦО, индуцированные с помощью наносекундной лазерной вспышки. В первом варианте (так называемый метод «флоу-флэш») изучается кинетика окисления молекулярным кислородом полностью восстановленного фермента (состояние R) в режиме одного оборота фермента. Чтобы время смешивания с кислородом не было лимитирующей стадией реакции, процесс взаимодействия с кислородом запускается фотолизом предварительно образованного комплекса CO с восстановленным биядерным центром ЦО [69]. Во втором случае — в фермент, переведенный исходно в одно из состояний восстановленности кислорода в BNC (O, P или F), производится «инъекция» электрона с помощью фотоактивируемых комплексов Rubpr (трис-бипиридилный комплекс рутения) [70].

Несмотря на то что второй подход был разработан позднее первого, в комбинации с прямым электрометрическим методом он был

использован раньше. Нужно отметить важное преимущество «инъекций» электрона в ЦО, которое заключается в возможности разделить наборы элементарных стадий переноса зарядов, сопряженные с отдельными одно-электронными переходами в каталитическом цикле. Кроме этого, методически окисление фермента молекулой кислорода в первом подходе происходит из ненаблюдаемого в обычных условиях полностью восстановленного состояния R (в котором в ферменте восстановлены, помимо BNC, еще и входные редокс-центры). В этом обзоре более детально освещены результаты, полученные при использовании «инъекций» электрона с помощью фотоактивируемых комплексов Rubpr. Подробное описание результатов, полученных при использовании метода «флоу-флэш», можно найти в блестящих обзорах [71, 72].

КИНЕТИКА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА МИТОХОНДРИАЛЬНОЙ ЦО

Впервые стадии транслокации зарядов в переходе $F \rightarrow O$ цитохромоксидазы митохон-

дрий сердечной мышцы быка были зарегистрированы совместными усилиями сотрудников лабораторий А.Д. Каулена и А.А. Константинова [73, 74]. Перенос электрона в ЦО запускался с помощью индуцированной лазерной вспышкой одноэлектронной «инъекции» от комплекса Rubpy. Позднее применение данного технического подхода было распространено на ЦО, зафиксированную в состоянии P_M (третий электрон в каталитическом цикле; рис. 2), а также полностью окисленное состояние O [63, 75, 76]. Через несколько лет после получения разрешенной во времени кинетики генерации мембранного потенциала ЦО в НИИФХБ имени Белозерского в Хельсинкской Биоэнергетической группе (Verkhovsky et al. [77]) был разработан подход, в котором использована комбинация разрешенной во времени электрометрической техники и метода «флоу-флэш».

При «инъекции» электрона в состояние F (переход $F \rightarrow O_N$) цитохромоксидазы семейства A были разрешены 3 основных компоненты генерации мембранного потенциала [73, 74]. «Быстрая» микросекундная фаза (~ 40 мкс) отражала перенос электрона от Cu_A к гему a . Две другие компоненты («средняя» (~ 1 мс) и «медленная» (~ 4 мс)) отражают стадии векторного переноса протонов в ферменте, вызванные переносом электрона от гема a в BNC. Сам по себе перенос электрона между гемом a и биядерным центром происходит вдоль мембраны, т.е. неэлектрогенно [22]. «Инъекция» электрона от Rubpy в состояние P митохондриальной ЦО (переход $P \rightarrow F$) сопровождается сходным по амплитуде, но несколько более быстрым набором протонных компонент генерации $\Delta\Psi$ [63], в то время как фотовосстановление окисленной ЦО («инъекция» в состоянии O) ограничивается восстановлением гема a от Cu_A [63, 70, 76].

Суммарная амплитуда миллисекундных электрогенных компонент в кинетиках генерации потенциала для стадий $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ имела близкое значение ($\sim 80\%$), что привело к первоначальной оценке суммарного перекачивания через мембрану ~ 3 -х протонов (или по $\sim 1,5$ «перекачиваемых» протона на каждой из одноэлектронных стадий окислительной фазы каталитического цикла [63, 73]). Данная оценка амплитуд в предстационарных измерениях была получена, используя эффект мембранного потенциала на стационарное редокс-равновесие между цитохромом c и гемом a [78]. Из него следовало, что перенос электрона от Cu_A к гему a (20% фотоэлектрического ответа; «быстрая» компонента) может быть эквива-

лентен транслокации элементарного заряда на $\frac{1}{2}$ величины диэлектрического барьера мембраны. Отсюда, суммарная амплитуда миллисекундных протонных фаз (80%) эквивалентна трансмембранной транслокации двух полных зарядов, что соответствовало бы переносу из внутренней водной фазы в BNC одного протона на половину толщины мембраны для протонирования восстановленного кислородного атома («субстратный» протон) и сопряженной транслокации двух «перекачиваемых» протонов: одного — через всю мембрану и еще одного — на половину ее толщины [63, 73]. Эта оценка согласовывалась со сделанными ранее выводами, полученными при изучении стационарного квазиравновесного обращения цитохромоксидазной реакции в сопряженных митохондриях. Предполагалось, что в окислительной фазе каталитического цикла ЦО может происходить перенос через мембрану всех четырех перекачиваемых протонов [79]. Было принято считать, что восстановительная часть фотоцикла не обладает достаточным запасом свободной энергии и не сопряжена с перекачиванием протонов, что следовало также из относительно низких значений редокс-потенциалов BNC в стационарных условиях (в состоянии O) [80].

КИНЕТИКА ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА БАКТЕРИАЛЬНЫХ ЦО СЕМЕЙСТВА A

Применение прямой электрометрии к изучению механизма работы ЦО получило дальнейшее развитие благодаря возможности направленного мутагенеза бактериальных ЦО семейства A , гомологичных ЦО митохондрий. Основными объектами большинства исследований являются 2 бактериальные ЦО aa_3 -типа: ЦО из *R. sphaeroides* [15, 28, 30, 31, 45, 81, 82] и из *P. denitrificans* [76, 83–86].

Исследование перехода $F \rightarrow O$ в мутантной ЦО aa_3 -типа из *R. sphaeroides* с несопряженным фенотипом (с заменой N139D [30, 87, 88]) привело к переоценке электрогенности одноэлектронных переходов в окислительной фазе ЦО. Оксидаза с мутацией N139D в D-канале полностью сохраняет кислород-редуктазную активность в стационарных измерениях, утратив способность к закислению внешнего пространства протеолипосом (т.е. к перекачке протонов через мембрану в стационарных измерениях). Генерация мембранного потенциала на стадии $F \rightarrow O$ в ответ на «инъекцию» электрона в этом мутанте отражает транслока-

цию через мембрану одного элементарного заряда, а именно: перенос электрона и протона с противоположных сторон мембраны к оксоферильному комплексу гема a_3 [30].

Соотношение амплитуд электрогенных составляющих переноса электрона с внешней стороны мембраны [30, 31] и субстратного протона из внутренней водной фазы в BNC ЦО с заменой N139D позволило оценить электрогенное расстояние гема a и биядерного центра от внешней водной фазы ($\sim 0,4$ толщины мембранного диэлектрика), что находится в близком соответствии со структурными данными [32, 36]. Соответственно, относительная амплитуда электрогенной фазы, отражающей перенос субстратного протона в мутанте N139D из внутренней водной фазы в BNC составило $\sim 0,6$ толщины мембранного диэлектрика. Суммарная амплитуда «средней» и «медленной» электрогенных фаз в переходах $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ ЦО дикого типа и ЦО митохондрий в ~ 4 раза больше амплитуды электрогенной фазы переноса электрона с внешней стороны мембраны к гему a [31, 63, 73], что эквивалентно переносу $\sim 1,6$ положительного заряда через всю толщину мембранного диэлектрика. То есть, помимо переноса одного субстратного протона из внутренней водной фазы в BNC ($\sim 0,6$ толщины мембранного диэлектрика), дополнительный электрогенный вклад в одноэлектронном переходе ЦО дикого типа, в сравнении с N139D, соответствует переносу через мембрану приблизительно одного протона. Иными словами, оба одноэлектронных перехода окислительной фазы каталитического цикла ЦО сопряжены с переносом одного субстратного протона в BNC и перекачиванием через мембрану не более одного протона. Близкие оценки были получены для переходов $P \rightarrow F$ и $F \rightarrow O$ в реакции полностью восстановленной ЦО с кислородом при измерении электрометрическим методом [89] и с помощью измерения кинетики протонирования рН-индикатора [90].

Независимо, Verkhovsky et al. [53] в Хельсинкской биоэнергетической группе были получены экспериментальные указания на то, что генерация суммарного мембранного потенциала восстановительной полуреакции каталитического цикла ЦО может включать в себя не только перенос протонов в BNC, но и трансмембранную перекачку протонов. Позднее в этой лаборатории была использована комбинация метода «флоу-флэш» для окисления полностью восстановленной ЦО молекулой O_2 в режиме одного оборота с последующей «инъекцией» электрона от Rubpr.

Таким образом, была исследована кинетика генерации мембранного потенциала, сопряженная с одноэлектронным восстановлением метастабильного окисленного состояния O_H цитохромоксидазы. С временным разрешением было показано [85, 86], что непосредственно после быстрого окисления полностью восстановленной ЦО образуется короткоживущее окисленное состояние O_H , в котором редокс-потенциал BNC значительно положительнее, чем в O . В отличие от O , «инъекция» электрона в ЦО в состоянии O_H сопровождается быстрым переносом электрона в BNC и сопряженными стадиями электрогенной транслокации протонов [65, 85, 86, 91, 92]. Характеристики электрогенных фаз в одноэлектронном переходе $O_H \rightarrow E_H$ [85, 86], в целом, напоминают таковые для переходов в окислительной фазе и согласуются с трансмембранной перекачкой одного протона. Перекачка протона в ходе перехода $O_H \rightarrow E_H$ была подтверждена и в случае естественного (а не искусственного, как Rubpr) донора электрона при исследовании гем-медной оксидазы семейства A (подсемейства A2) caa_3 из *T. thermophilus*, имеющей дополнительный редокс-центр (цитохром c) и соответственно, 5 электронов в полностью восстановленном состоянии [11]. При окислении молекулой кислорода полностью восстановленной оксидазы caa_3 из *T. thermophilus* в режиме одного оборота конечным переходом естественным образом является переход $O_H \rightarrow E_H$ [92]. Конечным акцептором электрона в переходе $O_H \rightarrow E_H$ ЦО caa_3 из *T. thermophiles*, как и в случае с искусственным донором электрона Rubpr, являлся Si_v .

Переход $E_H \rightarrow R$, по-видимому, также сопряжен с перекачкой одного протона. Однако стадия переноса второго электрона в каталитическом цикле ЦО до сих пор остается наименее изученной, поскольку не удается получить гомогенную популяцию фермента в одноэлектронном состоянии (E_H). В первую очередь это связано с трудностью зафиксировать фермент в одноэлектронном состоянии E_H и с множественностью возможных состояний как одноэлектронного (E и E_H), так и окисленного фермента (O и O_H), отличающихся функциональными свойствами. Так, обработка состояния F окисью углерода в стационарных условиях переводит ЦО в состояние E , имеющее на 1 электронный эквивалент больше, чем окисленное состояние O . Электронная инъекция в это состояние от Rubpr приводила к фотоэлектрическому ответу, схожему по характеристикам с переходом $F \rightarrow O$ [84]. Однако распределение электрона между редокс-

центрами в полученном таким образом состоянии E существенно отличается от такового для состояния E_H , образующегося при «инъекции» электрона от Rubp в ЦО в состоянии O_H [65, 86, 92].

ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ РОЛЬ ПРОТОН-ПРОВОДЯЩИХ ПУТЕЙ В КАТАЛИТИЧЕСКОМ ЦИКЛЕ ЦИТОХРОМОКСИДАЗ СЕМЕЙСТВА А

Изучение влияния мутаций протон-обменивающих групп на функциональные характеристики сопряженного переноса протонов ЦО свидетельствует о том, что электрогенная транслокация протонов цитохромоксидазами семейства А происходит через протон-проводящие структуры («каналы» D и K), содержащие критически важные консервативные протон-обменивающие остатки [30, 31, 45, 81]. Однако участие каналов в проведении протонов разных типов на отдельных стадиях каталитического цикла организовано нетривиально. Исходя из влияния мутаций по ряду аминокислотных остатков [93, 94], а также разрешенной трехмерной структуры ЦО [32, 36], предполагалось, что эти два канала специализированы и служат для проведения, соответственно, субстратных протонов (K-канал) и протонов, перекачиваемых через мембрану (D-канал).

Мутации, блокирующие как D-, так и K-канал, в том случае, если бы они отвечали за перенос протонов разных типов, должны были ингибировать переход $F \rightarrow O$. Однако если замены в D-канале приводят к подавлению миллисекундных компонент генерации потенциала и, соответственно, электрогенного переноса протонов на стадии $F \rightarrow O$, то блокирование K-канала не ингибировало электрогенный перенос протонов на этой стадии [30, 31, 45, 81]. При этом в условиях избытка субстратов дыхания, т.е. когда приток электронов не является лимитирующей стадией реакции, в мутантах по K-каналу затруднено восстановление биядерного центра (переход $O \rightarrow R$) вследствие блокирования захвата протонов из матрикса в BNC в восстановительной части каталитического цикла. Был сделан вывод, что D- и K-каналы отличаются не по типу проводимых протонов (субстратный или помпируемый), а по типу обслуживаемой полуреакции каталитического цикла [45, 81, 85].

Более поздние экспериментальные результаты свидетельствовали о том, что K-канал, по-видимому, не участвует в проведении перекачиваемых протонов вовсе, в то время

как D-канал обеспечивает перенос субстратных протонов в окислительной части цикла и всех перекачиваемых протонов в каталитическом цикле (как в окислительной фазе, так и в восстановительной). Действительно, если бы через K-канал происходил перенос перекачиваемых протонов, то мутация N139D в D-канале (сохраняющая кислород-редуктазную функцию, но полностью ингибирующая перекачивание протона через мембрану [30, 87]) не должна была бы влиять на перенос перекачиваемых протонов в восстановительной фазе каталитического цикла. В соответствии с этим не было выявлено мутаций по каналу K, специфически ингибирующих способность к перекачиванию протонов через мембрану. В настоящее время принято считать, что K-канал переносит один или оба (рис. 2) субстратных протона в восстановительной части цикла [12, 85, 95]. Было обнаружено, что присутствующая в структурах окисленной ЦО водородная связь гидроксильной группы фарнезильного заместителя гема a_3 с редокс-активным остатком тирозина (Y288) отсутствует в кристаллах восстановленной формы ЦО [40] и замещается молекулами воды. То есть может служить своего рода «защелкой» в верхней части K-канала.

Сигналом к выключению K-канала может служить образование оксоферрильного состояния гема a_3 при образовании интермедиата P в переходе $A \rightarrow P$. Образующееся оксеновое состояние атома кислорода (в качестве сильного аксиального лиганда гемового железа) может вызывать изменение конформации фермента, аналогично переходу $R \rightarrow T$ в гемоглобине [45]. Незначительное смещение зарядов внутри K-канала, перекрытого в верхней части, может происходить и на стадиях окислительной полуреакции каталитического цикла [31, 82]. Роль таких смещений зарядов внутри канала не ясна, но может приводить к уменьшению энергетического барьера для реакций переноса электрона внутрь гидрофобного белкового ядра ЦО.

В митохондриальной цитохромоксидазе в дополнение к D- и K-каналам рассматривается возможное участие третьего протонного пути — H-канала, роль которого в проведении протонов остается предметом дискуссий [34, 96]. Согласно мнению авторов рентгеноструктурного анализа ЦО млекопитающих [34, 35, 96], идентифицировавших этот гипотетический протон-проводящий путь, H-канал служит для проведения перекачиваемых протонов в ЦО с N-стороны мембраны через окрестность гема a к остатку D51, располагающемуся вблизи P-стороны мембраны. Функция этого

канала и регуляция проведения протонов по нему, включая физиологические аспекты этой регуляции, изучена мало [14]. Согласно одной из гипотез, Н-канал участвует в проведении перекачиваемого протона через всю мембрану [97]; согласно другой — используется только верхняя часть этого пути [98]. Наконец, согласно третьей гипотезе, Н-канал не выполняет функцию перекачивания протонов вообще, а является так называемым диэлектрическим «колодцем», роль которого может заключаться в модуляции редокс-потенциала близлежащего переносчика электронов гема *a* [99, 100].

Есть указания, что мутации в Н-канале могут ингибировать протон-транслоцирующую функцию в митохондриальной ЦО [34, 96]. Однако направленный мутагенез в ферменте высших эукариот сложен технически, что затрудняет интерпретацию получаемых результатов [101]. В то же время выходная часть протонного Н-канала, конформационные изменения в которой являются ключевым моментом альтернативного гипотетического механизма перекачивания протонов митохондриальной ЦО, не сохраняется в гомологичных бактериальных оксидазах [102, 103]. Более того, мутации по гомологичным остаткам канала Н не ингибируют бактериальные ЦО *aa₃*-типа [103, 104]. Исследования цитохром-оксидазы низших эукариот (дрожжей) не поддерживают концепцию о роли Н-канала в перекачивании протонов [16].

МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ МЕМБРАННОГО ПОТЕНЦИАЛА ЦО В ХОДЕ ОДНОЭЛЕКТРОННОГО ПЕРЕХОДА $F \rightarrow O$

Для идентификации электрогенных процессов, лежащих в основе «средней» и «медленной» фаз кинетики генерации мембранного потенциала ЦО в переходе $F \rightarrow O$, оказалось полезным исследованием эффектов влияния на них изотопного замещения и ионов цинка. Электрогенные фазы значительно отличаются между собой эффектом изотопного замещения, что позволило идентифицировать их аналоги при исследовании мутантных форм и соотнести их с переносом протонов разного типа [30]. «Средняя» фаза отсутствовала в несопряженном мутанте с заменой в D-канале (N139D), сохраняющем кислород-редуктазную активность без перекачивания протонов через мембрану. Это указывает на связь «средней» фазы с переносом перекачиваемого протона и на то, что перекачиваемый протон переме-

щается раньше субстратного. Соответственно, «медленная» фаза сохранялась в мутанте и была интерпретирована как перенос субстратного протона в BNC.

В присутствии ионов цинка (ингибитора протонного транспорта), добавленных снаружи к протеолипосомам с ЦО митохондрий или ЦО *aa₃* дикого типа из *R. sphaeroides* [15, 105], «медленная» электрогенная протонная фаза замедлялась. Такого же эффекта на «среднюю» электрогенную фазу не наблюдалось. Также отсутствовал эффект ионов цинка на протонную электрогенную фазу в несопряженном мутанте N139D. В совокупности это свидетельствует о том, что «медленная» электрогенная фаза в диком типе содержит в своем составе стадию высвобождения перекачиваемого протона на внешнюю сторону мембраны и что именно этот процесс, по всей вероятности, является скоростью-лимитирующей реакцией для всей «медленной» электрогенной фазы [15]. В отличие от входных протонных путей, траектории выхода протонов на внешнюю сторону мембраны в ЦО мало изучены. Есть указания на то, что путь выхода молекул воды организован в виде дискретной траектории через две каналоподобные структуры, которые могут принимать участие также в проведении перекачиваемого протона на внешнюю сторону мембраны [52, 106]. В ходе изучения влияния разных концентраций цинка на кинетику генерации мембранного потенциала встроенной в мембрану протеолипосомы цитохром-оксидазы *aa₃* из *R. sphaeroides* были получены экспериментальные результаты, указывающие на наличие не менее двух отдельных эффективных сайтов связывания ионов Zn^{2+} ЦО с *P*-стороны мембраны. Также они свидетельствовали о том, что выход перекачиваемого протона из сайта загрузки протонов (PLS) ЦО во внешнюю водную фазу может осуществляться по нескольким траекториям [15].

В случае анализа «средней» и «медленной» протонных фаз, согласно модели последовательных реакций, значения их относительных амплитуд имеют близкую величину [107, 108]. При нормировании к амплитуде «быстрой» электрогенной компоненты относительная амплитуда «средней» и «медленной» электрогенных фаз для перехода $F \rightarrow O$ в митохондриальном ферменте составляет ~1,9–2,1 от величины «быстрой» электрогенной фазы, т.е. соответствует переносу суммарно двух протонов через большую часть мембранного диэлектрика [108]. Как уже было сказано, D-канал обеспечивает перенос и перекачиваемого, и субстратного протонов в переходах

окислительной фазы каталитического цикла ЦО [45, 81]. Поэтому «средняя» и «медленная» протонные электрогенные фазы могут быть интерпретированы как 2 последовательных идентичных процесса репротонирования некоторого ключевого остатка в D-канале, располагающегося в окрестности биядерного центра, с минорным вкладом других сопряженных внутрибелковых перемещений заряда [107, 109, 110].

В качестве промежуточного донора протона, обеспечивающего проведение перекачиваемого и субстратного протонов, служит консервативный остаток E286, располагающийся в верхней части D-канала (рис. 3). E286 является точкой бифуркации в транслокации протонов через D-канал либо по пути переноса субстратного протона к центру гема a_3/Cu_B , либо на внешнюю сторону мембраны. Замена E286 на непротонируемый аналог (E286Q) ингибирует перенос и перекачиваемого, и субстратного протонов в одноэлектронном переходе $F \rightarrow O$ [45, 81]. При исследовании мутации N139L, перекрывающей вход в D-канал, была выявлена электрогенная стадия переноса протона от предполагаемого первичного донора протона для BNC (остатка E286) в каталитический центр BNC и установлено электрогенное расстояние между ними ($\sim 0,15$ толщины мембранного диэлектрика) [31]. Это находится в близком соответствии со структурными данными, согласно которым расстояние до остатка E286 от внутренней водной фазы составляет $\sim 0,56$ геометрической толщины мембраны [107]. В условиях дефицита протонов в D-канале (с депротонированным E286) роль донора протона для BNC может выполнять остаток Y35 в средней части канала [27].

Одноэлектронный переход $F \rightarrow O$ в гем-медных оксидазах семейства А при «инъекции» электрона от RubpV начинается с восстановления Cu_A и электрогенного переноса электрона от Cu_A на гем a («быстрая» компонента кинетики генерации $\Delta\Psi$) (рис. 3; [17]). Возможное смещение положительного заряда внутри закрытого K-канала в ответ на восстановление гема a может облегчить этот процесс (стадия 2' на рис. 3; [31]). Перенос электрона от гема a к гему $a_3^{4+}=\text{O}^{2-}$ происходит вдоль плоскости мембраны практически электро-нейтрально. Транслокация протонов начинается с переноса перекачиваемого протона от остатка E286 в «ловушку» протонов (PLS), расположенную выше BNC. В разных гем-медных оксидазах семейства А в качестве PLS могут рассматриваться А-пропионат гема a_3 и/или один из гистидиновых лигандов Cu_B [111, 112].

Есть указания на то, что роль PLS может выполняться кластером протон-обменивающих групп, включающим пропионаты А и D гема a_3 и расположенные вблизи остатки (D52 и K171, как в случае ЦО митохондрий) [113], либо гидрофильным доменом над гемом a [98].

В переходе $F \rightarrow O$ субстратный протон переносится также от остатка E286 непосредственно в BNC, а сам остаток E286 в ходе всего перехода дважды репротонируется через D-канал. «Средняя» электрогенная фаза включает в себя электрогенный перенос протона H^+ от остатка E286 к первичному акцептору протона (PLS), а также одно из последовательных электрогенных репротонирований остатка E286 из внутренней водной N-фазы через D-канал (рис. 3). «Медленная» электрогенная фаза включает в себя второе репротонирование остатка E286, следующее за переносом протона, участвующего в химическом превращении кислорода, от E286—COOH к BNC.

Есть указания на то, что собственно перенос протона от E286 в BNC (стадия 5) входит в состав «медленной» электрогенной фазы в случае ЦО из *R. sphaeroides* и в состав «средней» электрогенной фазы в случае ЦО из митохондрий [28]. В ходе переноса субстратного протона в BNC происходит нейтрализация перенесенного туда электрона, отрицательный заряд которого мог стабилизировать находящийся в PLS перекачиваемый протон. Перенос нового протона вглубь мембранного диэлектрика при репротонировании остатка E286 должен приводить к электростатическому выталкиванию перекачиваемого протона из PLS [112, 114, 115]. Соответственно, «медленная» электрогенная фаза включает в себя также высвобождение протона из PLS на внешнюю сторону мембраны, которое может быть замедлено добавлением ионов цинка с P-стороны мембраны (рис. 3).

ПРИМЕНЕНИЕ ПРЯМОЙ ЭЛЕКТРОМЕТРИИ К ИССЛЕДОВАНИЮ ГЕМ-МЕДНЫХ ОКСИДАЗ СЕМЕЙСТВА В

Для понимания механизма сопряженного протонного насоса цитохромоксидазы большое значение имеет изучение всего многообразия надсемейства гем-медных терминальных оксидаз [8], включая гораздо менее изученные и эволюционно отдаленные семейства В и С [19, 116, 117]. Изучение оксидаз семейств В и С начато относительно недавно, активно развивается в последние годы [29, 95, 118, 119].

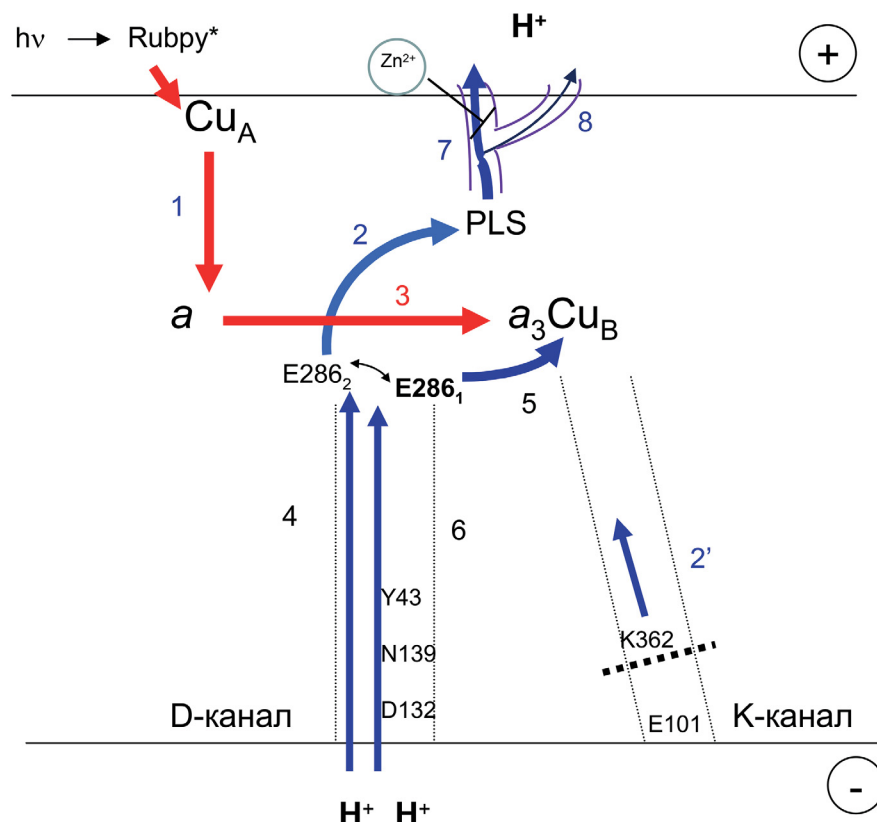


Рис. 3. На схеме приведены электрогенные стадии, разрешаемые при одноэлектронной фотоинъекции с помощью Rubpy в переходе $F \rightarrow O$ (перенос четвертого электрона в каталитическом цикле цитохромоксидазы). Перед началом реакции гем a_3 находится в оксоферрильном состоянии (не показано). Красные стрелки указывают направление переноса электрона, в то время как синие — стадии транслокации протонов. Показаны 2 протон-проводящих пути (D- и K-каналы), приведены ряд консервативных аминокислотных остатков в них. Стадии 1 и 3 отражают перенос электрона от Cu_A к гему a и от гема a в BNC соответственно. В ходе перехода $F \rightarrow O$ оба протона (субстратный и перекачиваемый) переносятся через D-канал. Предполагается, что изомеризация E286 (переход между конформациями E286₁ и E286₂) предшествует переносу протона от E286 к сайту загрузки перекачиваемого протона (PLS). Частные стадии переноса протонов (2, 4) входят в состав «средней» электрогенной фазы, в то время как стадии 6 и 7 — в состав «медленной». Показан дополнительный путь выхода перекачиваемого протона из PLS (8), выявляемый в присутствии ионов цинка [15]. Перенос протона от E286 в BNC (стадия 5) предположительно входит в состав «средней» (в случае ЦО из митохондрий) и «медленной» (ЦО из *R. sphaeroides*) электрогенных фаз соответственно. Стадия 2' — возможное смещение заряда в K-канале в ответ на восстановление гема a [31]

Не в последней степени это связано с их широкой распространенностью в патогенных микроорганизмах, наряду с не содержащими медь оксидазами *bd*-типа, и, соответственно, важным биомедицинским значением [120].

В случае ЦО ba_3 из *T. thermophilus*, типичного представителя семейства В, с помощью прямого электрометрического метода была обнаружена интересная особенность активного центра BNC этого фермента [121]. ЦО ba_3 -типа из *T. thermophilus* в исходном окисленном состоянии не реагирует с экзогенными лигандами и поэтому ее не удается перевести и стабилизировать в состоянии Р или F с помощью обработки перекисью водорода или СО [121] так, как это делалось для типичных aa_3 -оксидаз [63]. Однако при «инъекции» электрона от Rubpy в находящуюся в полностью окис-

ленном состоянии О цитохромоксидазу ba_3 из *T. thermophilus* в присутствии перекиси водорода наблюдается дополнительная электрогенная реакция, скорость которой прямо пропорциональна концентрации добавленной перекиси. Иными словами, фактически неактивный в окисленном состоянии по отношению к внешним лигандам BNC ЦО ba_3 из *T. thermophilus* приобретает способность связывать лиганды (переходит в активное/открытое состояние) в ответ на одноэлектронную «инъекцию» и восстановление гема b [121].

Важным обстоятельством в контексте уникальности и пользы применения прямого электрометрического метода к изучению цитохромоксидазы ba_3 -типа из *T. thermophilus* является то, что оцениваемые по степени закисления внешнего отсека протеолипосом в условиях

стационарной кислород-редуктазной реакции усредненные параметры каталитического цикла этого фермента свидетельствуют о вариабельности стехиометрии перекачивания протонов. В отличие от оксидаз семейства А, стехиометрия перекачивания протонов в ЦО семейств В и С в стационарных измерениях может варьировать в значительных пределах: в среднем от 0,5 протона на электрон (H^+/e^-), поступающий в ВНС, до $\sim 0,85 H^+/e^-$ [66, 118, 121–124]. Прямой электрометрический метод позволяет получить и сравнить электрогенные параметры одноэлектронных переходов по отдельности и получить уникальную информацию об особенностях механизма сопряжения.

Для ЦО *ba₃* из *T. thermophilus*, как типичного представителя семейства В, были разрешены стадии электрогенного переноса протонов в окислительной фазе каталитического цикла [122] и в первом переходе восстановительной части каталитического цикла [66]. Были выявлены стадии, перенос электрона в которых не сопряжен с перекачиванием протона через мембрану, что объясняет снижение эффективной стехиометрии перекачки протонов и ее значительную вариабельность в оксидазах семейства В [66, 122]. В частности, было показано, что, в отличие от оксидаз семейства А, в окислительной фазе каталитического цикла ЦО *ba₃* из *T. thermophilus* происходит перекачивание одного протона через мембрану вместо двух [122]. В то же время перенос одного электрона в восстановительной части каталитического цикла (переход $O_H \rightarrow E_H$) также не сопряжен с перекачиванием протонов через мембрану, что может быть следствием влияния формирующегося в окислительной фазе каталитического цикла мембранного потенциала [66].

В первичной последовательности ЦО семейства В, по-видимому, сохраняется и функционирует лишь один входной протонный канал, гомологичный К-каналу оксидаз семейства А [5, 29]. С помощью прямого электрометрического метода было прямо показано, что, в отличие от семейства А, в ЦО семейства В для переноса и субстратных, и перекачиваемых протонов в окислительной фазе каталитического цикла необходим К-канал. Мутация T315V в К-канале ЦО *ba₃* из *T. thermophilus* приводит как к замедлению перехода $F \rightarrow O_H$ вследствие замедления переноса субстратного протона в ВНС, так и к десопряжению, т.е. к полному отсутствию перекачки протонов в окислительной фазе каталитического цикла [29].

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке Российского научного фонда (грант № 23-24-00143).

Благодарность. В первую очередь автор хотел бы выразить свою глубочайшую благодарность безвременно ушедшим А.А. Константинову, А.Д. Каулену, М.И. Верховскому, Л.А. Драчеву, В.П. Скулачеву. Сотрудничество с этими выдающимися учеными в разное время оказало на автора неизгладимое впечатление. Также автор очень благодарен Д.Л. Заславскому, И.А. Смирновой, И.Н. Белевичу, проф. М. Викстрему и проф. Р. Геннису за сотрудничество в исследованиях гем-медных оксидаз с применением прямого электрометрического метода.

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. Anraku, Y. (1988) Bacterial electron transport chains, *Ann. Rev. Biochem.*, **57**, 101–132, doi: 10.1146/annurev.bi.57.070188.000533.
2. Garcia-Horsman, J. A., Barquera, B., Rumbley, J., Ma, J., and Gennis, R. B. (1994) The superfamily of heme-copper respiratory oxidases, *J. Bacteriol.*, **176**, 5587–5600, doi: 10.1128/jb.176.18.5587–5600.1994.
3. Babcock, G. T., and Wikström, M. (1992) Oxygen activation and the conservation of energy in cell respiration, *Nature*, **356**, 301–309, doi: 10.1038/356301a0.
4. Ferguson-Miller, S., and Babcock, G. T. (1996) Heme/copper terminal oxidases, *Chem. Rev.*, **7**, 2889–2907, doi: 10.1021/cr950051s.
5. Hemp, J., and Gennis, R. B. (2008) Diversity of the heme-copper superfamily in archaea: insights from genomics and structural modeling, *Results Probl. Cell Differ.*, **45**, 1–31, doi: 10.1007/400_2007_046.
6. Rich, P. R. (2017) Mitochondrial cytochrome c oxidase: catalysis, coupling and controversies, *Biochem. Soc. Trans.*, **45**, 813–829, doi: 10.1042/BST20160139.
7. 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.

8. Pereira, M. M., Santana, M., and Teixeira, M. (2001) A novel scenario for the evolution of haem-copper oxygen reductases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 185-208, doi: 10.1016/S0005-2728(01)00169-4.
9. Yoshikawa, S., and Shimada, A. (2015) Reaction mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **115**, 1936-1989, doi: 10.1021/cr500266a.
10. Fee, J. A., Yoshida, T., Surerus, K. K., and Mather, M. W. (1993) Cytochrome *caa3* from the thermophilic bacterium *Thermus thermophilus*: a member of the heme-copper oxidase superfamily, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **25**, 103-114, doi: 10.1007/BF00762852.
11. Siletsky, S. A., Belevich, I., Soulimane, T., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2013) The fifth electron in the fully reduced *caa3* from *Thermus thermophilus* is competent in proton pumping, *Biochim. Biophys. Acta*, **1827**, 1-9, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.09.013.
12. Wikström, M., Krab, K., and Sharma, V. (2018) Oxygen activation and energy conservation by cytochrome *c* oxidase, *Chem. Rev.*, **118**, 2469-2490, doi: 10.1021/acs.chemrev.7b00664.
13. Forte, E., Borisov, V. B., Siletsky, S. A., Petrosino, M., and Giuffrè, A. (2019) In the respiratory chain of *Escherichia coli* cytochromes *bd-I* and *bd-II* are more sensitive to carbon monoxide inhibition than cytochrome *bo3*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1860**, 148088, doi: 10.1016/j.bbabi.2019.148088.
14. Bjorck, M. L., Vilhjalmsdottir, J., Hartley, A. M., Meunier, B., Nasvik Ojemyr, L., Marechal, A., and Brzezinski, P. (2019) Proton-transfer pathways in the mitochondrial *S. cerevisiae* cytochrome *c* oxidase, *Sci. Rep.*, **9**, 20207, doi: 10.1038/s41598-019-56648-9.
15. Siletsky, S. A., and Gennis, R. B. (2021) Time-resolved electrometric study of the $F \rightarrow O$ transition in cytochrome *c* oxidase. The effect of Zn^{2+} ions on the positive side of the membrane, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 105-122, doi: 10.1134/S0006297921010107.
16. Marechal, A., Xu, J. Y., Genko, N., Hartley, A. M., Haraux, F., Meunier, B., and Rich, P. R. (2020) A common coupling mechanism for A-type heme-copper oxidases from bacteria to mitochondria, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **117**, 9349-9355, doi: 10.1073/pnas.2001572117.
17. Siletsky, S. A. (2013) Steps of the coupled charge translocation in the catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase, *Front. Biosci. (Landmark Ed)*, **18**, 36-57, doi: 10.2741/4086.
18. Fee, J. A., Sanders, D., Slutter, C. E., Doan, P. E., Aasa, R., Karpfors, M., and Vänngård, T. (1995) Multi-frequency epr evidence for a binuclear Cu_A center in cytochrome *c* oxidase: studies with a ^{63}Cu - and ^{65}Cu -enriched, soluble domain of the cytochrome *ba3*, subunit II from *Thermus Thermophilus*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **212**, 77-83, doi: 10.1006/bbrc.1995.1938.
19. Soulimane, T., Buse, G., Bourenkov, G. B., Bartunik, H. D., Huber, R., and Than, M. E. (2000) Structure and mechanism of the aberrant *ba3*-cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*, *EMBO J.*, **19**, 1766-1776, doi: 10.1093/emboj/19.8.1766.
20. Pitcher, R. S., and Watmough, N. J. (2004) The bacterial cytochrome *cbb3* oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 388-399, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.09.017.
21. Buschmann, S., Warkentin, E., Xie, H., Langer, J. D., Ermler, U., and Michel, H. (2010) The structure of *cbb3* cytochrome oxidase provides insights into proton pumping, *Science*, **329**, 327-330, doi: 10.1126/science.1187303.
22. Mitchell, P. (1968) *Chemiosmotic coupling and energy transduction*, Glynn Research Ltd., Bodmin.
23. Wikström, M. (1977) Proton pump coupled to cytochrome *c* oxidase in mitochondria, *Nature*, **266**, 271-273, doi: 10.1038/266271a0.
24. Wikström, M. (2004) Cytochrome *c* oxidase: 25 years of the elusive proton pump, *Biochim. Biophys. Acta*, **1655**, 241-247, doi: 10.1016/j.bbabi.2003.07.013.
25. Drachev, L. A., Jasaitis, A. A., Kaulen, A. D., Kondrashin, A. A., Liberman, E. A., Nemecek, I. B., Ostroumov, S. A., Semenov, A., 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.
26. 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.
27. Belevich, I., Gorbikova, E., Belevich, N. P., Rauhamaki, V., Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2010) Initiation of the proton pump of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 18469-18474, doi: 10.1073/pnas.1010974107.
28. Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2012) Cytochrome *c* oxidase: charge translocation coupled to single-electron partial steps of the catalytic cycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 476-488, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.08.003.
29. Siletsky, S. A., Soulimane, T., Belevich, I., Gennis, R. B., and Wikström, M. (2021) Specific inhibition of proton pumping by the T315V mutation in the K channel of cytochrome *ba3* from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1862**, 148450, doi: 10.1016/j.bbabi.2021.148450.
30. Siletsky, S. A., Pawate, A. S., Weiss, K., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2004) Transmembrane charge separation during the ferryl-oxo $\rightarrow$ oxidized transition in a non-pumping mutant of cytochrome *c* oxidase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 52558-52565, doi: 10.1074/jbc.M407549200.
31. Siletsky, S. A., Zhu, J., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (2010) Partial steps of charge

- translocation in the nonpumping N139L mutant of *Rhodobacter sphaeroides* cytochrome *c* oxidase with a blocked D-channel, *Biochemistry*, **49**, 3060-3073, doi: 10.1021/bi901719e.
32. Tsukihara, T., Aoyama, H., Yamashita, E., Takashi, T., Yamaguichi, H., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., and Yoshikawa, S. (1996) The whole structure of the 13-subunit oxidized cytochrome *c* oxidase at 2.8 Å, *Science*, **272**, 1136-1144, doi: 10.1126/science.272.5265.1136.
 33. Yoshikawa, S., Shinzawa-Itoh, K., Nakashima, R., Yaono, R., Inoue, N., Yao, M., Fei, M. J., Libeu, C. P., Mizushima, T., Yamaguchi, H., Tomizaki, T., and Tsukihara, T. (1998) Redox-coupled crystal structural changes in bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Science*, **280**, 1723-1729, doi: 10.1126/science.280.5370.1723.
 34. Tsukihara, T., Shimokata, K., Katayama, Y., Shimada, H., Muramoto, K., Aoyama, H., Mochizuki, M., Shinzawa-Itoh, K., Yamashita, E., Yao, M., Ishimura, Y., and Yoshikawa, S. (2003) The low-spin heme of cytochrome *c* oxidase as the driving element of the proton-pumping process, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15304-15309, doi: 10.1073/pnas.2635097100.
 35. Muramoto, K., Hirata, K., Shinzawa-Itoh, K., Yoko-o, S., Yamashita, E., Aoyama, H., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S. (2007) A histidine residue acting as a controlling site for dioxygen reduction and proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 7881-7886, doi: 10.1073/pnas.0610031104.
 36. Iwata, S., Ostermeier, C., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) Structure at 2.8 Å resolution of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Nature*, **376**, 660-669, doi: 10.1038/376660a0.
 37. Ostermeier, C., Iwata, S., Ludwig, B., and Michel, H. (1995) F_V fragment-mediated crystallization of the membrane protein bacterial cytochrome *c* oxidase, *Nat. Struct. Biol.*, **2**, 842, doi: 10.1038/nsb1095-842.
 38. Koepke, J., Olkhova, E., Angerer, H., Muller, H., Peng, G., and Michel, H. (2009) High resolution crystal structure of *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase: New insights into the active site and the proton transfer pathways, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 635-645, doi: 10.1016/j.bbabo.2009.04.003.
 39. Svensson-Ek, M., Abramson, J., Larsson, G., Tornroth, S., Brzezinski, P., and Iwata, S. (2002) The X-ray crystal structures of wild-type and EQ(I-286) mutant cytochrome *c* oxidases from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Mol. Biol.*, **321**, 329-339, doi: 10.1016/S0022-2836(02)00619-8.
 40. Qin, L., Liu, J., Mills, D. A., Proshlyakov, D. A., Hiser, C., and Ferguson-Miller, S. (2009) Redox dependent conformational changes in cytochrome *c* oxidase suggest a gating mechanism for proton uptake, *Biochemistry*, **48**, 5121-5130, doi: 10.1021/bi9001387.
 41. Abramson, J., Riistama, S., Larsson, G., Jasaitis, A., Svensson-Ek, M., Laakkonen, L., Puustinen, A., Iwata, S., and Wikström, M. (2000) The structure of the ubiquinol oxidase from *Escherichia coli* and its ubiquinone binding site, *Nat. Struct. Biol.*, **7**, 910-917, doi: 10.1038/82824.
 42. Noor, M. R., and Soulimane, T. (2013) Structure of *caa*(₃) cytochrome *c* oxidase – a nature-made enzyme-substrate complex, *Biol. Chem.*, **394**, 579-591, doi: 10.1515/hsz-2012-0343.
 43. Luna, V. M., Chen, Y., Fee, J. A., and Stout, C. D. (2008) Crystallographic studies of Xe and Kr binding within the large internal cavity of cytochrome *ba*₃ from *Thermus thermophilus*: structural analysis and role of oxygen transport channels in the heme-Cu oxidases, *Biochemistry*, **47**, 4657-4665, doi: 10.1021/bi800045y.
 44. Fetter, J. R., Qian, J., Shapleigh, J., Thomas, J. W., Garcia-Horsman, A., Schmidt, E., Hosler, J., Babcock, G. T., Gennis, R. B., and Ferguson-Miller, S. (1995) Possible proton relay pathways in cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **92**, 1604-1608, doi: 10.1073/pnas.92.5.1604.
 45. 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.
 46. Gennis, R. B. (1998) Multiple proton-conducting pathways in cytochrome oxidase and a proposed role for the active-site tyrosine, *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 241-248, doi: 10.1016/S0005-2728(98)00075-9.
 47. Branden, M., Tomson, F., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2002) The entry point of the K-proton-transfer pathway in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **41**, 10794-10798, doi: 10.1021/bi026093+.
 48. Hofacker, I., and Schulten, K. (1998) *Proteins: Structure, Function, and Genetics*, **30**, 100-107, doi: 10.1002/(SICI)1097-0134(199801)30:1<100::AID-PROT9>3.0.CO;2-S.
 49. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Proton exit channels in bovine cytochrome *c* oxidase, *J. Phys. Chem. B*, **109**, 1999-2006, doi: 10.1021/jp0464371.
 50. Riistama, S., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., and Wikström, M. (2000) Binding of O₂ and its reduction are both retarded by replacement of valine 279 by isoleucine in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **39**, 6365-6372, doi: 10.1021/bi000123w.
 51. Salomonsson, L., Lee, A., Gennis, R. B., and Brzezinski, P. (2004) A single-amino-acid lid renders a gas-tight compartment within a membrane-bound transporter, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 11617-11621, doi: 10.1073/pnas.0402242101.

52. Schmidt, B., McCracken, J., and Ferguson-Miller, S. (2003) A discrete water exit pathway in the membrane protein cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 15539-15542, doi: 10.1073/pnas.2633243100.
53. Verkhovsky, M. I., Jasaitis, A., Verkhovskaya, M. L., Morgan, L., and Wikström, M. (1999) Proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **400**, 480-483, doi: 10.1038/22813.
54. Chance, B., Saronio, C., and Leigh, J. S., Jr. (1975) Functional intermediates in the reaction of membrane-bound cytochrome oxidase with oxygen, *J. Biol. Chem.*, **250**, 9226-9237, doi: 10.1016/S0021-9258(19)40634-0.
55. Hill, B. C., and Greenwood, C. (1983) Spectroscopic evidence for the participation of compound A ($\text{Fea}_3^{2+}\text{-O}_2$) in the reaction of mixed-valence cytochrome *c* oxidase with oxygen at room temperature, *Biochem. J.*, **215**, 659-667, doi: 10.1042/bj2150659.
56. Muramoto, K., Ohta, K., Shinzawa-Itoh, K., Kanda, K., Taniguchi, M., Nabekura, H., Yamashita, E., Tsukihara, T., and Yoshikawa, S. (2010) Bovine cytochrome *c* oxidase structures enable O_2 reduction with minimization of reactive oxygens and provide a proton-pumping gate, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7740-7745, doi: 10.1073/pnas.0910410107.
57. Kitagawa, T., and Ogura, T. (1997) Oxygen activation mechanism at the binuclear site of heme-copper oxidase superfamily as revealed by time-resolved resonance Raman spectroscopy, in *Progress in Inorganic Chemistry* (Karlin, K. D., ed) Wiley & Sons, pp. 431-479, doi: 10.1002/9780470166468.ch6.
58. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., and Babcock, G. T. (1998) Dioxygen activation and bond cleavage by mixed-valence cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 8020-8025, doi: 10.1073/pnas.95.14.8020.
59. Proshlyakov, D. A., Pressler, M. A., DeMaso, C., Leykam, J. F., DeWitt, D. L., and Babcock, G. T. (2000) Oxygen activation and reduction in respiration: involvement of redox-active tyrosine 244, *Science*, **290**, 1588-1591, doi: 10.1126/science.290.5496.1588.
60. Buse, G., Soulimane, T., Dewor, M., Meyer, H. E., and Bloggel, M. (1999) Evidence for a copper coordinated histidine-tyrosine crosslink in the active site of cytochrome oxidase, *Protein Sci.*, **8**, 985-990, doi: 10.1110/ps.8.5.985.
61. Rauhamaki, V., Baumann, M., Soliymani, R., Puustinen, A., and Wikström, M. (2006) Identification of histidin-tyrosin cross-link in the active site of the *cbb3*-type cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 16135-16140, doi: 10.1073/pnas.0606254103.
62. Babcock, G. T. (1999) How oxygen is activated and reduced in respiration, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 12971-12973, doi: 10.1073/pnas.96.23.12971.
63. Siletsky, S., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1999) Resolution of electrogenic steps coupled to conversion of cytochrome *c* oxidase from the peroxy to the ferryl-oxo state, *Biochemistry*, **38**, 4853-4861, doi: 10.1021/bi982614a.
64. Sharma, V., Karlin, K. D., and Wikstrom, M. (2013) Computational study of the activated OH state in the catalytic mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **110**, 16844-16849, doi: 10.1073/pnas.1220379110.
65. Siletsky, S. A., Belevich, I., Wikström, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2009) Time-resolved $\text{O}_\text{H} \rightarrow \text{E}_\text{H}$ transition of the aberrant *ba3* oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 201-205, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.12.020.
66. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Wikström, M. (2017) Time-resolved generation of membrane potential by *ba3* cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus* coupled to single electron injection into the O and OH states, *Biochim. Biophys. Acta*, **1858**, 915-926, doi: 10.1016/j.bbabi.2017.08.007.
67. Siletsky, S. A., Mamedov, M. D., Lukashev, E. P., Balashov, S. P., Dolgikh, D. A., Rubin, A. B., Kirpichnikov, M. P., and Petrovskaya, L. E. (2016) Electrogenic steps of light-driven proton transport in ESR, a retinal protein from *Exiguobacterium sibiricum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1857**, 1741-1750, doi: 10.1016/j.bbabi.2016.08.004.
68. Kaulen, A. D. (2000) Electrogenic processes and protein conformational changes accompanying the bacteriorhodopsin photocycle, *Biochim. Biophys. Acta*, **1460**, 204-219, doi: 10.1016/S0005-2728(00)00140-7.
69. Gibson, Q. H., and Greenwood, C. (1963) Reactions of cytochrome oxidase with oxygen and carbon monoxide, *Biochem. J.*, **86**, 541-554, doi: 10.1042/bj0860541.
70. Nilsson, T. (1992) Photoinduced electron transfer from tris(2,2'-bipyridyl)ruthenium to cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 6497-6501, doi: 10.1073/pnas.89.14.6497.
71. Belevich, I., and Verkhovsky, M. I. (2008) Molecular mechanism of proton translocation by cytochrome *c* oxidase, *Antioxid. Redox Signal.*, **10**, 1-29, doi: 10.1089/ars.2007.1705.
72. Kaila, V. R., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2010) Proton-coupled electron transfer in cytochrome oxidase, *Chem. Rev.*, **110**, 7062-7081, doi: 10.1021/cr1002003.
73. Zaslavsky, D., Kaulen, A., Smirnova, I. A., Vygodina, T. V., 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.
74. Zaslavsky, D. L., Smirnova, I. A., Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Millett, F., and Konstantinov, A. A. (1995) Rapid kinetics of membrane potential

- generation by cytochrome *c* oxidase with the photoactive Ru(II)-tris-bipyridyl derivative of cytochrome *c* as electron donor, *FEBS Lett.*, **359**, 27-30, doi: 10.1016/0014-5793(94)01443-5.
75. Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., and Konstantinov, A. A. (1997) Electrogenic events associated with peroxy- to ferryl-oxo state transition in cytochrome *c* oxidase, *Eur. J. Biophys.*, **26**, 98.
 76. Verkhovsky, M. I., Tuukkanen, A., Backgren, C., Puustinen, A., and Wikström, M. (2001) Charge translocation coupled to electron injection into oxidized cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **40**, 7077-7083, doi: 10.1021/bi010030u.
 77. Verkhovsky, M. I., Morgan, J. E., Verkhovskaya, M., and Wikström, 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.
 78. Hinkle, P., and Mitchell, P. (1970) Effect of membrane potential on the redox poise between cytochrome *a* and cytochrome *c* in rat liver mitochondria, *J. Bioenerg.*, **1**, 45-60, doi: 10.1007/BF01516088.
 79. Wikström, M. (1989) Identification of the electron transfers in cytochrome oxidase that are coupled to proton-pumping, *Nature*, **338**, 776-778, doi: 10.1038/338776a0.
 80. Wikström, M., Krab, K., and Saraste, M. (1981) *Cytochrome Oxidase – A Synthesis*, Academic Press, New York.
 81. Siletsky, S. A., Kaulen, A. D., Mitchell, D., Gennis, R. B., and Konstantinov, A. A. (1996) Resolution of two proton conduction pathways in cytochrome *c* oxidase, *EBEC Short Rep.*, **9**, 90.
 82. Lepp, H., Svahn, E., Faxen, K., and Brzezinski, P. (2008) Charge transfer in the K proton pathway linked to electron transfer to the catalytic site in cytochrome *c* oxidase, *Biochemistry*, **47**, 4929-4935, doi: 10.1021/bi7024707.
 83. Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Ludwig, B., Michel, H., and Fendler, K. (2000) Single-electron reduction of the oxidized state is coupled to proton uptake via the K pathway in *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 4632-4636, doi: 10.1073/pnas.080079097.
 84. Ruitenbergh, M., Kannt, A., Bamberg, E., Fendler, K., and Michel, H. (2002) Reduction of cytochrome *c* oxidase by a second electron leads to proton translocation, *Nature*, **417**, 99-102, doi: 10.1038/417099a.
 85. Bloch, D., Belevich, I., Jasaitis, A., Ribacka, C., Puustinen, A., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2004) The catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase is not the sum of its two halves, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 529-533, doi: 10.1073/pnas.0306036101.
 86. Belevich, I., Bloch, D. A., Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Exploring the proton pump mechanism of cytochrome *c* oxidase in real time, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 2685-2690, doi: 10.1073/pnas.0608794104.
 87. Pawate, A. S., Morgan, J., Namslawer, A., Mills, D., Brzezinski, P., Ferguson-Miller, S., and Gennis, R. B. (2002) A mutation in subunit I of cytochrome oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* results in an increase in steady-state activity but completely eliminates proton pumping, *Biochemistry*, **41**, 13417-13423, doi: 10.1021/bi026582+.
 88. Pfitzner, U., Hoffmeier, K., Harrenga, A., Kannt, A., Michel, H., Bamberg, E., Richter, O.-M. H., and Ludwig, B. (2000) Tracing the D-pathway in reconstituted site-directed mutants of cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **39**, 6756-6762, doi: 10.1021/bi992235x.
 89. Ribacka, C., Verkhovsky, M. I., Belevich, I., Bloch, D. A., Puustinen, A., and Wikström, M. (2005) An elementary reaction step of the proton pump is revealed by mutation of tryptophan-164 to phenylalanine in cytochrome *c* oxidase from *Paracoccus denitrificans*, *Biochemistry*, **44**, 16502-16512, doi: 10.1021/bi0511336.
 90. Faxen, K., Gilderson, G., Adelroth, P., and Brzezinski, P. (2005) A mechanistic principle for proton pumping by cytochrome *c* oxidase, *Nature*, **437**, 286-289, doi: 10.1038/nature03921.
 91. Brand, S. E., Rajagukguk, S., Ganesan, K., Geren, L., Fabian, M., Han, D., Gennis, R. B., Durham, B., and Millett, F. (2007) A new ruthenium complex to study single-electron reduction of the pulsed O_H state of detergent-solubilized cytochrome oxidase, *Biochemistry*, **46**, 14610-14618, doi: 10.1021/bi701424d.
 92. Siletsky, S. A., Belevich, I., Belevich, N. P., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2011) Time-resolved single-turnover of *caa*₃ oxidase from *Thermus thermophilus*. Fifth electron of the fully reduced enzyme converts O_H into E_H state, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 1162-1169, doi: 10.1016/j.bbabbio.2011.05.006.
 93. Thomas, J. W., Puustinen, A., Alben, J. O., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1993) Substitution of asparagine for aspartate-135 in subunit I of the cytochrome *bo* ubiquinol oxidase of *Escherichia coli* eliminates proton-pumping activity, *Biochemistry*, **32**, 10923-10928, doi: 10.1021/bi00091a048.
 94. Garcia-Horsman, J. A., Puustinen, A., Gennis, R. B., and Wikström, M. (1995) Proton transfer in cytochrome *bo*₃ ubiquinol oxidase of *Escherichia coli*: second site mutations in subunit I that restore proton pumping in the decoupled mutant Asp135Asn, *Biochemistry*, **34**, 4428-4433, doi: 10.1021/bi00013a035.
 95. 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.
 96. Shimokata, K., Katayama, Y., Murayama, H., Sue-matsu, M., Tsukihara, T., Muramoto, K., Aoyama, H.,

- Yoshikawa, S., and Shimada, H. (2007) The proton pumping pathway of bovine heart cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 4200-4205, doi: 10.1073/pnas.0611627104.
97. Yoshikawa, S., Shimada, A., and Shinzawa-Itoh, K. (2015) Respiratory conservation of energy with dioxygen: cytochrome *c* oxidase, *Met. Ions Life Sci.*, **15**, 89-130, doi: 10.1007/978-3-319-12415-5_4.
 98. Capitanio, N., Palese, L. L., Capitanio, G., Martino, P. L., Richter, O. M., Ludwig, B., and Papa, S. (2012) Allosteric interactions and proton conducting pathways in proton pumping *aa₃* oxidases: heme *a* as a key coupling element, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 558-566, doi: 10.1016/j.bbabi.2011.11.003.
 99. Rich, P. R., and Marechal, A. (2013) Functions of the hydrophilic channels in protonmotive cytochrome *c* oxidase, *J. R. Soc. Interface*, **10**, 20130183, doi: 10.1098/rsif.2013.0183.
 100. Sharma, V., Jambrina, P. G., Kaukonen, M., Rosta, E., and Rich, P. R. (2017) Insights into functions of the H channel of cytochrome *c* oxidase from atomistic molecular dynamics simulations, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, E10339-E10348, doi: 10.1073/pnas.1708628114.
 101. Wikström, M., and Verkhovsky, M. I. (2007) Mechanism and energetics of proton translocation by the respiratory heme-copper oxidases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1200-1214, doi: 10.1016/j.bbabi.2007.06.008.
 102. Salje, J., Ludwig, B., and Richter, O.-M. H. (2005) Is a third proton-conducting pathway operative in bacterial cytochrome *c* oxidase? *Biochem. Soc. Trans.*, **33**, 829-831, doi: 10.1042/BST0330829.
 103. Lee, H.-m., Das, T. K., Rousseau, D. L., Mills, D., Fergusson-Miller, S., and Gennis, R. (2000) Mutations in the putative H-channel in the cytochrome *c* oxidase from *Rhodobacter sphaeroides* show that this channel is not important for proton conduction but reveals modulation of the properties of heme *a*, *Biochemistry*, **39**, 2989-2996, doi: 10.1021/bi9924821.
 104. Pfitzner, U., Odenwald, A., T., O., Weingard, L., Ludwig, B., and Richter, O. M. (1998) Cytochrome *c* oxidase (heme *aa₃*) from *Paracoccus denitrificans*: analysis of mutations in putative proton channels of subunit I, *J. Bioenerg. Biomembr.*, **30**, 89-97, doi: 10.1023/A:1020515713103.
 105. Kuznetsova, S. S., Azarkina, N. V., Vygodina, T. V., Siletsky, S. A., and Konstantinov, A. A. (2005) Zinc ions as cytochrome *c* oxidase inhibitors: two sites of action, *Biochemistry (Moscow)*, **70**, 128-136, doi: 10.1007/s10541-005-0091-6.
 106. Sugitani, R., and Stuchebrukhov, A. A. (2009) Molecular dynamics simulation of water in cytochrome *c* oxidase reveals two water exit pathways and the mechanism of transport, *Biochim. Biophys. Acta*, **1787**, 1140-1150, doi: 10.1016/j.bbabi.2009.04.004.
 107. Medvedev, D. M., Medvedev, E. S., Kotelnikov, A. I., and Stuchebrukhov, A. A. (2005) Analysis of the kinetics of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection, *Biochim. Biophys. Acta*, **1710**, 47-56, doi: 10.1016/j.bbabi.2005.08.008.
 108. Siletsky, S., and Konstantinov, A. A. (2006) Electro-genic mechanism of cytochrome *c* oxidase, *The 8th European Biological Chemistry Conference*, p. 80.
 109. Siletsky, S. A., Han, D., Brand, S., Morgan, J. E., Fabian, M., Geren, L., Millett, F., Durham, B., Konstantinov, A. A., and Gennis, R. B. (2006) Single-electron photoreduction of the P_M intermediate of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1757**, 1122-1132, doi: 10.1016/j.bbabi.2006.07.003.
 110. Sugitani, R., Medvedev, E. S., and Stuchebrukhov, A. A. (2008) Theoretical and computational analysis of the membrane potential generated by cytochrome *c* oxidase upon single electron injection into the enzyme, *Biochim. Biophys. Acta*, **1777**, 1129-1139, doi: 10.1016/j.bbabi.2008.05.006.
 111. Kaila, V. R., Sharma, V., and Wikström, M. (2011) The identity of the transient proton loading site of the proton-pumping mechanism of cytochrome *c* oxidase, *Biochim. Biophys. Acta*, **1807**, 80-84, doi: 10.1016/j.bbabi.2010.08.014.
 112. Popovic, D. M., and Stuchebrukhov, A. A. (2004) Proton pumping mechanism and catalytic cycle of cytochrome *c* oxidase: Coulomb pump model with kinetic gating, *FEBS Lett.*, **566**, 126-130, doi: 10.1016/j.febslet.2004.04.016.
 113. Lu, J., and Gunner, M. R. (2014) Characterizing the proton loading site in cytochrome *c* oxidase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 12414-12419, doi: 10.1073/pnas.1407187111.
 114. Rich, P. R. (1995) Towards an understanding of the chemistry of oxygen reduction and proton translocation in the iron-copper respiratory oxidases, *Aust. J. Plant Physiol.*, **22**, 479-486, doi: 10.1071/PP9950479.
 115. Wikström, M., and Sharma, V. (2018) Proton pumping by cytochrome *c* oxidase – a 40 year anniversary, *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*, **1859**, 692-698, doi: 10.1016/j.bbabi.2018.03.009.
 116. Zimmermann, B. H., Nitsche, C. I., Fee, J. A., Rusnak, F., and Munck, E. (1988) Properties of a copper-containing cytochrome *ba₃*: a second terminal oxidase from the extreme thermophile *Thermus Thermophilus*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **85**, 5779-5783, doi: 10.1073/pnas.85.16.5779.
 117. Rauhamaki, V., Bloch, D. A., Verkhovsky, M. I., and Wikström, M. (2009) Active site of cytochrome *cbb₃*, *J. Biol. Chem.*, **284**, 11301-11308, doi: 10.1074/jbc.M808839200.
 118. Rauhamaki, V., Bloch, D. A., and Wikström, M. (2012) Mechanistic stoichiometry of proton translocation by cytochrome *cbb₃*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 7286-7291, doi: 10.1073/pnas.1202151109.

119. Steimle, S., van Eeuwen, T., Ozturk, Y., Kim, H. J., Braitbard, M., Selamoglu, N., Garcia, B. A., Schneidman-Duhovny, D., Murakami, K., and Daldal, F. (2021) Cryo-EM structures of engineered active $bc_1\text{-}cbb_3$ type CIII₂CIV super-complexes and electronic communication between the complexes, *Nat. Commun.*, **12**, 929, doi: 10.1038/s41467-021-21051-4.
120. 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.
121. Siletskiy, S., Soulimane, T., Azarkina, N., Vygodina, T. V., Buse, G., Kaulen, A., and Konstantinov, A. (1999) Time-resolved generation of membrane potential by ba_3 cytochrome *c* oxidase from *Thermus thermophilus*. Evidence for reduction-induced opening of the binuclear centre, *FEBS Lett.*, **457**, 98-102, doi: 10.1016/S0014-5793(99)01019-4.
122. Siletsky, S. A., Belevich, I., Jasaitis, A., Konstantinov, A. A., Wikström, M., Soulimane, T., and Verkhovsky, M. I. (2007) Time-resolved single-turnover of ba_3 oxidase from *Thermus thermophilus*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1767**, 1383-1392, doi: 10.1016/j.bbabo.2007.09.010.
123. Kannt, A., Lancaster, C. R., and Michel, H. (1998) The coupling of electron transfer and proton translocation: electrostatic calculations on *Paracoccus denitrificans* cytochrome *c* oxidase, *Biophys. J.*, **74**, 708-721, doi: 10.1016/S0006-3495(98)73996-7.
124. Rauhamaki, V., and Wikström, M. (2014) The causes of reduced proton-pumping efficiency in type B and C respiratory heme-copper oxidases, and in some mutated variants of type A, *Biochim. Biophys. Acta*, **1837**, 999-1003, doi: 10.1016/j.bbabo.2014.02.020.

INVESTIGATION OF THE MECHANISM OF MEMBRANE POTENTIAL GENERATION BY HEME-COPPER RESPIRATORY OXIDASES IN REAL TIME MODE

Review

S. A. Siletsky

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

Heme-copper respiratory oxidases are highly efficient molecular machines. These membrane enzymes catalyze the final stage of cellular respiration of eukaryotes and many prokaryotes: the transfer of electrons from cytochromes or quinols to molecular oxygen and the reduction of O₂ to water. The free energy released in this redox reaction is converted by heme-copper respiratory oxidases into a transmembrane gradient of the electrochemical potential of hydrogen ions ($\Delta\mu\text{H}^+$). Heme-copper respiratory oxidases have a unique mechanism for generation $\Delta\mu\text{H}^+$ — a redox-coupled proton pump. The use of a combination of a direct electrometric method for measuring the kinetics of membrane potential generation with approaches and methods of prestationary kinetics and directed mutagenesis in the study of heme-copper oxidases makes it possible to obtain unique information about the movement of protons inside the protein in real time. The review summarizes the results of the use of the permitted time.

Keywords: bioenergetics, cytochrome oxidase, proteoliposomes, electrogenic, proton transfer, generation $\Delta\Psi$, proton pump, photoreduction, cytochrome *aa₃*, kinetics, direct electrometric method, capacitive potentiometry, time resolution, zinc ions