

ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЗАЩИТА НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА У *AZOTOBACTER VINELANDII*

© 2005 г.

Ю. В. БЕРЦОВА,

О. В. ДЕМИН и А. В. БОГАЧЕВ

НИИ физико-химической биологии им. А. Н. Белозерского
Московского государственного университета им. М. В. Ломоносова,
Москва

I. Введение. II. Краткое описание фиксации молекулярного азота и структуры нитрогеназного комплекса. III. Дыхательная защита нитрогеназного комплекса у *A. vinelandii*. IV. Морфологические особенности клеток *A. vinelandii*, способствующие осуществлению механизма дыхательной защиты. V. Заключение.

I. ВВЕДЕНИЕ

Большинство азотфиксирующих бактерий не способно ассимилировать N_2 в условиях высокого содержания кислорода в окружающей среде, так как нитрогеназный комплекс, осуществляющий реакцию восстановления азота, необратимо инактивируется при взаимодействии с O_2 . Исключением из этого правила является строго аэробный микроорганизм *Azotobacter vinelandii*, который эффективно фиксирует молекулярный азот даже при очень высоких концентрациях O_2 в среде роста. Однако нитрогеназный комплекс этого микроорганизма также чувствителен к кислороду, как и у других бактерий. Таким

Принятые сокращения: ΔpH — трансмембранная разность значений pH; $\Delta\mu_{H^+}$ — разность электрохимических потенциалов ионов водорода; $\Delta\psi$ — трансмембранная разность значений электрических потенциалов; dNADH — никотинамид гипоксантин динуклеотид, восстановленный; NDH I — бактериальная NADH:хинон-оксидоредуктаза, гомолог митохондриального Комплекса I; NDH II — бактериальная несопряженная NADH:хинон-оксидоредуктаза; Q_1 — 2,3-диметокси-5-метил-6-изопренил-1,4-бензохинон; ТМФД — N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин.

Адрес для корреспонденции: sodiumc@genebee.msu.su (А. В. Богачев).

Работа поддержана РФФИ, грант № 04-04-48101.

Авторы благодарны В. П. Скулачеву за ценные замечания и Л. Е. Бакеевой за проведение электронного микрофотографирования.

образом, должен существовать какой-то специальный механизм, позволяющий *A. vinelandii* защищать нитрогеназу от инактивации O_2 .

Настоящий обзор посвящен описанию набора уникальных биохимических и морфологических особенностей *A. vinelandii*, позволяющих этой бактерии защищать нитрогеназный комплекс от инактивации кислородом. Ведущая роль в данном процессе принадлежит дыхательной цепи, состоящей из несопряженной NADH:хинон-оксидоредуктазы и хинолоксидазы *bd*-типа. Исключительно высокая активность этой цепи позволяет *A. vinelandii* снижать концентрацию кислорода в цитоплазме до такого низкого уровня, при котором нитрогеназный комплекс уже не испытывает повреждающего действия O_2 .

II. КРАТКОЕ ОПИСАНИЕ ФИКСАЦИИ МОЛЕКУЛЯРНОГО АЗОТА И СТРУКТУРЫ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Биологическая фиксация молекулярного азота является ключевым процессом круговорота азота в биосфере. Выделение N_2 в атмосферу происходит в результате разнообразнейших реакций, начиная с антропогенного сжигания биомассы и заканчивая жизнедеятельностью бактерий, метаболизм которых основан на получении энергии за счет денитрификации. Из-за этих процессов происходит постоянное истощение почвы по химически связанному азоту. Поэтому очень важным является обратный процесс, при котором происходит связывание молекулярного азота воздуха и его восстановление до солей аммония, которые в дальнейшем могут быть использованы для анаболических процессов как самими азотфиксаторами, так и другими организмами.

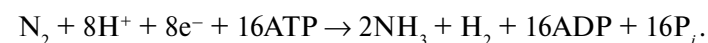
В биологической фиксации N_2 принимают участие только прокариоты, однако способность к восстановлению молекулярного азота не является уникальным свойством, присущим лишь какой-либо одной группе бактерий. Азотфиксирующие микроорганизмы являются представителями широкого круга сильно различающихся таксономических групп, как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий. По характеру метаболизма это могут быть автотрофные или гетеротрофные, облигатно-анаэробные, факультативно аэробные или облигатно-аэробные бактерии. Внутри одного семейства лишь несколько родов или видов бактерий могут оказаться способными к азотфиксации. Такое распределение азотфиксирующих организмов среди прокариот позволяет считать, что способность к восстановлению молекулярного азота возникла на очень ранних этапах эволюции. Вероятно, у многих видов соответствующая генетическая информация была впоследствии утеряна в результате их адаптации к изменившимся условиям окружающей среды. Альтернативным объяснением такого

разнообразия азотфиксирующих микроорганизмов может служить процесс горизонтального переноса генетического материала у бактерий.

Концепция общего начала для системы, осуществляющей азотфиксацию, хорошо согласуется с поразительным сходством физико-химических характеристик для данных ферментов среди всех известных в настоящее время азотфиксирующих микроорганизмов. Реакцию восстановления молекулярного азота до аммиака осуществляет ферментативный комплекс, называемый нитрогеназой. Нитрогеназный комплекс состоит из двух компонентов: динитрогеназы (MoFe-белка) и редуктазы динитрогеназы (Fe-белка). Первый компонент — MoFe-белок — является тетрамером, состоящим из двух пар различных субъединиц (типа $2\alpha 2\beta$). В составе этого белка выделяют Р-кластеры и М-кластеры. В первую группу входят четыре железосерных кластера типа $[4Fe-4S]$, а во вторую — два Fe-Mo кофактора нитрогеназы. Fe-Mo кофактор состоит из двух субкластеров типа $[4Fe-3S]$ и $[Mo-3Fe-3S]$, координация атомов металлов в которых осуществляется за счет кислотолабильной серы и гомоцитрата [30, 63, 64, 75, 76]. Молекулярная масса динитрогеназы составляет приблизительно 245 кД. Субъединицы динитрогеназы организованы в тетраэдрический комплекс, в котором молекулы Fe-Mo кофактора локализованы на α -субъединицах белка, причем расстояние между внутренними краями кофакторов составляет примерно 7 Å, что позволяет считать этот район местом связывания молекулы азота. Благодаря большой электронной емкости, кластерная структура FeMo-белка способна осуществлять накопление электронов для многоэлектронного восстановления молекулы азота в активном центре нитрогеназы [6, 63].

Динитрогеназа редуктаза (Fe-белок, второй компонент нитрогеназного комплекса) является гомодимером, состоящим из субъединиц с молекулярной массой 64 кД, и содержит железосерные кластеры типа $[4Fe-4S]$. На Fe-белке локализован центр связывания MgATP. После присоединения этой молекулы белок приобретает способность служить донором электронов для Mo-Fe белка [6, 30, 63].

Предполагается, что нитрогеназный комплекс состоит из Mo-Fe белка и Fe-белка, связанных в соотношении 2:1. При восстановлении одной молекулы азота до аммиака этот ферментативный комплекс гидролизует 16 молекул ATP [63, 64]. Физиологическим донором электронов для нитрогеназы у большинства азотфиксирующих микроорганизмов является ферредоксин или флаводоксин. Общая реакция восстановления молекулярного азота, катализируемая нитрогеназным комплексом, может быть представлена следующим образом:



Одновременно с восстановлением азота нитрогеназа образует молекулярный водород (гидрогеназная функция нитратредуктазы). Считается, что такое АТР-зависимое выделение водорода — «паразитный процесс», приводящий к расходу восстановительных эквивалентов и АТР, и в отсутствие N_2 водород является преобладающим продуктом реакции. Даже в оптимальных для работы нитрогеназы условиях лишь 50–70% электронов, поступающих на фермент, идут на восстановление азота, а остальные расходуются нитрогеназой на восстановление протонов. Эффективность азотфиксации *in vivo* может повышаться, если дыхательная цепь микроорганизма содержит гидрогеназу, функционирование которой приводит к рециклизации выделяемого водорода [90]. Нитрогеназа помимо азота может восстанавливать и ряд других соединений, содержащих тройную связь, таких как ацетилен, азид или цианид. Ацетилен восстанавливается до этилена, и эта реакция является на сегодняшний день рутинным методом для определения нитрогеназной активности.

Общая структура описанного выше нитрогеназного комплекса относится к так называемой Мо-нитрогеназе (нитрогеназе-I), найденной у всех известных азотфиксирующих организмов. Для *Azotobacter spp.* описано существование еще двух альтернативных нитрогеназ. Показано, что при выращивании этих бактерий в среде, лимитированной по молибдену, но содержащей ванадий, экспрессируется ванадий-содержащая V-нитрогеназа (нитрогеназа-II), а в отсутствие обоих этих металлов — содержащая только железо Fe-нитрогеназа (нитрогеназа-III). Динитрогеназа редуктаза (Fe-белок) по структуре и функциям сходна у всех трех ферментов. В то же время наблюдаются различия между Мо-зависимой и альтернативными нитрогеназами, для которых показано существование третьей дополнительной γ -субъединицы [55, 80].

ВЛИЯНИЕ КИСЛОРОДА НА АКТИВНОСТЬ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА

Ингибирующее действие O_2 на процесс азотфиксации было отмечено на еще очень ранних стадиях исследования свободноживущих и симбиотических diaзотрофных микроорганизмов. В ходе исследования таких факультативно аэробных бактерий, как *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa* и *Mycobacterium flavum*, было показано, что они способны к diaзотрофному росту только в анаэробных или в микроаэробных условиях. В то же время эти бактерии способны расти в аэробных условиях, если в среде присутствует подходящий источник связанного азота. Эффективность фиксации молекулярного азота (количество восстановленного N_2 /количество потребленного O_2) у

данных микроорганизмов возрастает в 10–20 раз при снижении парциального давления кислорода от 0,21 до 0,01 атм., и зависимость нитрогеназной активности от pO_2 представляет собой типичную колоколообразную кривую [29]. Позднее, в прямых экспериментах по чувствительности нитрогеназы к кислороду, выполненных на выделенных ферментах из различных бактерий, было показано, что нитрогеназа в равной степени повреждается под действием кислорода как в случае фермента, полученного из такой облигатно-анаэробной бактерии, как *Clostridium pasteurianum*, так и из строго-аэробного микроорганизма *A. vinelandii* [29, 73] (относительно недавно были получены указания на существование особой, кислородостойчивой формы нитрогеназы у *Streptomyces thermoautotrophicus* [72], однако эти данные еще требуют дополнительного экспериментального подтверждения). Известно, что автотрофные азотфиксирующие микроорганизмы также очень чувствительны к O_2 . Большинство diaзотрофных фотосинтетических бактерий способно к фиксации азота на свету только при анаэробном культивировании. Эти факты также позволяют предположить, что нитрогеназная система возникла на заре эволюции, когда содержание O_2 в атмосфере было еще низким.

Показано, что при экспонировании на воздухе необратимо инактивируются оба компонента нитрогеназы. Динитрогеназа редуктаза является наиболее чувствительным к кислороду компонентом нитрогеназного комплекса. Время полужизни этого белка в присутствии O_2 составляет, в зависимости от объекта, из которого был выделен фермент, лишь 30–120 сек. Динитрогеназа несколько стабильнее и время ее полужизни составляет около 4,5–10 мин [29]. Ингибирование нитрогеназной активности, по-видимому, связано с повреждением Fe-S кластеров, что приводит также к нарушению структуры белка. Такой поврежденный белок в дальнейшем гидролизуете протеазами.

РЕГУЛЯЦИЯ ЭКСПРЕССИИ НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА У *A. vinelandii*

Субъединицы динитрогеназы (МоFe-белка) являются у *A. vinelandii* продуктами генов *nifD* и *nifK*, ген *nifH* кодирует белок динитрогеназы редуктазы (Fe-белка). Эти гены локализованы в одном опероне [22]. Синтез белков нитрогеназного комплекса находится под контролем регуляторных белков NifL и NifA [35]. Транскрипция большинства генов, связанных с процессом азотфиксации, осуществляется РНК-полимеразой с фактором σ^{54} (NtrA) вместо стандартного σ^{70} . Белок NifA является σ^{54} -зависимым активатором транскрипции, а белок NifL ингибирует его активность в ответ на присутствие источников связанного азота, при высокой концентрации кислорода и в

ответ на снижение энергетического статуса клетки (соотношения АТФ/АДП). Таким образом, регуляторный белок NifL чувствителен сразу к трем параметрам, таким как $[\text{NH}_4^+]$, $[\text{O}_2]$ и $[\text{АТФ}]/[\text{АДП}]$ [14]. Белок NifL состоит из двух доменов, соединенных глутамин-обогащенным линкером. N-концевой домен содержит два консервативных S-бокса, что характерно для так называемого PAS-домена, входящего в состав многих рецепторных белков [7]. С-концевой домен демонстрирует высокую гомологию с первичным передающим доменом рецепторных белков двухкомпонентных регуляторных систем [7], содержит АТФ-связывающий участок и консервативный остаток гистидина. Однако, несмотря на такое сходство NifL с рецепторными гистидин-киназами, не удалось продемонстрировать автофосфорилирования этого белка. Более того, мутация по консервативному гистидину, являющемуся акцептором фосфатной группы у гистидин-киназ, никак не сказывается на регуляторных свойствах NifL [14].

Белок NifL содержит в своем составе нековалентно связанный FAD. В опытах *in vitro* было показано, что этот кофактор быстро окисляется на воздухе, и белок NifL, содержащий окисленный флаavin, ингибирует активность NifA [35]. Также было показано, что такое ингибирование требует образования комплекса окисленного NifL с NifA в соотношении 1:1. Таким образом, кислородзависимая регуляция экспрессии нитрогеназного комплекса осуществляется за счет изменения окислительно-восстановительного состояния FAD. Энергозависимая регуляция, по-видимому, связана со способностью белка NifL в присутствии АДП усиливать ингибирование активности белка NifA [35]. Было высказано предположение, что за связывание АДП может отвечать один из консервативных участков в С-концевом домене NifL.

О механизме азотзависимой регуляции, осуществляемой белком NifL, известно очень мало. Показано, что этот белок нечувствителен напрямую к таким источникам азота, как аммоний, глутамат или глутамин. Предполагается, что в азотзависимую регуляцию вовлечен еще один сенсорный белок или какой-то дополнительный эффектор. В роли такого дополнительного белка предположительно может выступать продукт гена *nifX*, демонстрирующий значительную гомологию с ферментом уридилтрансферазой [35].

Таким образом, индукция белков нитрогеназного комплекса происходит, когда выполняются все три из перечисленных ниже условий: 1) в среде роста отсутствуют источники связанного азота и требуется переход к фиксации N_2 ; 2) концентрация O_2 в цитоплазме находится на низком уровне, таком, что нитрогеназный комплекс не будет испытывать его повреждающего действия; 3) соотношение

АТФ/АДП в цитоплазме высоко, так что крайне энергоемкий процесс азотфиксации будет обеспечен достаточным количеством АТФ [34].

ЗАЩИТА НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА ОТ ПОВРЕЖДАЮЩЕГО ДЕЙСТВИЯ КИСЛОРОДА У РАЗЛИЧНЫХ АЗОТФИКСИРУЮЩИХ МИКРООРГАНИЗМОВ

Хотя биохимические характеристики нитрогеназного комплекса и его высокая чувствительность к кислороду являются одинаковыми у всех известных на сегодняшний день азотфиксирующих бактерий, механизмы, позволяющие предотвратить ингибирующее действие O_2 на этот фермент, у разных микроорганизмов различны.

Понятно, что защита нитрогеназы от кислорода не является «проблемой» для организмов, растущих только в анаэробных условиях, таких как *Clostridium spp.* или *Desulfovibrio spp.*

Такие факультативно-аэробные бактерии, как *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus polymyxa* или *Rhodospirillum rubrum*, могут расти на источниках связанного азота как в аэробных, так и в анаэробных условиях. Однако, они фиксируют молекулярный азот лишь в отсутствие кислорода [29], в аэробных же условиях происходит репрессия синтеза нитрогеназы.

Микроаэрофильные бактерии (например *Azospirillum spp.* и свободно живущие представители рода *Rhizobium*) не способны ассимилировать молекулярный азот в анаэробных условиях и в условиях повышенного содержания кислорода и восстанавливают N_2 лишь при субатмосферном pO_2 , избегая зон с неблагоприятными концентрациями кислорода за счет аэротаксиса.

В случае микроорганизмов, живущих в симбиозе с высшими растениями, защита нитрогеназы от необратимой инактивации кислородом обеспечивается поддержанием очень низкой концентрации O_2 в клубеньковых клетках организма хозяина. Важную роль в этом процессе играет специальный белок растений — леггемоглобин, который работает как переносчик и буфер кислорода и находится в окружающей бактерию среде [90].

Азотфиксирующие цианобактерии (например *Anabaena spp.*) сталкиваются с еще более серьезными трудностями, так как эти микроорганизмы отличаются способностью не только к азотфиксации, но также и к фотосинтезу. Как известно, при работе фотосистемы II происходит выделение кислорода, и, если бы процессы азотфиксации и фотосинтеза проходили в пределах одной клетки одновременно, то это приводило бы к быстрому повреждению нитрогеназного комплекса. Действительно, нитчатые цианобактерии используют морфологически различающиеся клетки для разделения процессов азотфиксации и фотосинтеза. Гетероциста — клетка, в которой располагается

нитрогеназный комплекс, лишена фотосистем, демонстрирует высокие скорости дыхания [15], а также обладает толстой клеточной стенкой, создающей дополнительный диффузионный барьер для кислорода [29, 90].

В случае способных к азотфиксации одноклеточных цианобактерий, таких как *Cyanothece spp.*, было высказано предположение, что защита нитрогеназного комплекса от кислорода, выделяемого при фотосинтезе, может осуществляться не за счет разнесения процессов фотосинтеза и азотфиксации в пространстве (как в случае нитчатых цианобактерий), а за счет смещения во времени пиков их активности. В суточном цикле фазы азотфиксации и фотосинтеза сдвинуты друг относительно друга на 12 часов [15, 24].

Строго аэробные условия роста *A. vinelandii* с широким диапазоном концентраций O_2 , в которых он способен эффективно фиксировать молекулярный азот, позволяют предполагать, что эта бактерия использует совершенно другие механизмы для защиты своего нитрогеназного комплекса.

III. ДЫХАТЕЛЬНАЯ ЗАЩИТА НИТРОГЕНАЗНОГО КОМПЛЕКСА У *A. vinelandii*

На самых ранних этапах изучения *A. vinelandii* было отмечено, что в отличие от остальных микроорганизмов, фиксация молекулярного азота данной бактерией осуществляется в широком диапазоне концентраций O_2 , хотя этот процесс более эффективен в условиях пониженного содержания кислорода в среде роста. Исследования хемотропных культур *A. vinelandii* показали, что повышение аэрации среды роста приводит не только к некоторому снижению эффективности азотфиксации (количество восстановленного азота/количество потребленной сахарозы), но и к значительному снижению экономического коэффициента (прирост биомассы/потребленный субстрат). По данным Хмель и соавторов, увеличение протока кислорода через среду роста ($0,5, 4,08$ и $10,32 \text{ г } O_2 \cdot \text{л}^{-1} \cdot \text{час}^{-1}$) приводит к снижению этого коэффициента почти в три раза ($0,269, 0,133$ и $0,103$, соответственно) [9]. Хотелось бы отметить, что для неспособных к фиксации N_2 бактерий данная зависимость обычно является обратной, то есть при повышении аэрации среды экономический коэффициент возрастает. Было показано, что падение энергетического коэффициента у *A. vinelandii* при увеличении аэрации не зависит от природы источника углерода [10].

Таким образом, при повышении $[O_2]$ расход энергетического материала у *A. vinelandii* увеличивается без соответствующего увеличения прироста биомассы. В то же время известно, что при высоких кон-

центрациях кислорода клетки *A. vinelandii* развивают очень высокие скорости дыхания, являющиеся максимальными среди исследованных бактерий [40, 85]. Возможно, что такое активное, в значительной степени не связанное с запасанием энергии дыхание выполняет какую-то особую физиологическую функцию у данной бактерии.

В 1969 году Дальтон и Постгейт [26] выдвинули гипотезу, объясняющую способность *Azotobacter* к диазотрофному росту даже при очень высоких концентрациях кислорода. В работах этих авторов было постулировано существование двух стратегий, реализуемых *A. vinelandii* при диазотрофном росте в среде с высоким содержанием кислорода. Одна из них заключается в способностях нитрогеназного комплекса к временной (обратимой) инактивации посредством конформационных изменений во время кратковременного кислородного стресса. Вторая стратегия, получившая название «дыхательной защиты», основана на значительном увеличении клетками скорости дыхания, в результате чего концентрация кислорода в цитоплазме понижается до уровня, при котором нитрогеназа уже не испытывает повреждающего действия O_2 .

В результате дальнейших исследований были получены данные, подтверждающие эту гипотезу. Так, было показано, что скорость дыхания *A. vinelandii* в значительной степени зависит от концентрации кислорода, и максимальное дыхание наблюдается при высоком содержании O_2 в среде роста [42, 68]. Также было показано, что эффективность сопряжения синтеза АТФ с дыханием падает в случае перехода культуры от ассимиляции аммония к азотфиксации [33]. В частности, были получены указания на то, что падение сопряжения происходит как на уровне NADH:убихинон оксидоредуктазы [41], так и на уровне терминальных оксидаз [11]. Таким образом, в условиях, когда необходимо снижение цитоплазматической концентрации O_2 для защиты нитрогеназного комплекса, скорость дыхания клеток значительно возрастает, и это, по-видимому, связано с понижением степени сопряженности дыхательной цепи. Следующие разделы данной работы будут посвящены описанию особенностей дыхательной цепи *A. vinelandii*, позволяющие этой бактерии развивать высочайшие скорости дыхания и, таким образом, осуществлять механизм дыхательной защиты.

ТЕРМИНАЛЬНЫЕ УЧАСТОК ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ *A. vinelandii*

На ранних этапах изучения *A. vinelandii* было показано, что терминальный участок дыхательной цепи этой бактерии предположительно содержит две терминальные оксидазы: хинолоксидазу *d*-типа и цитохромоксидазу *o*-типа [33]. Было показано, что при функционировании цитохромоксидазой ветви дыхательной цепи, процесс окисления убихинола цитохромоксидазой *A. vinelandii* чувствителен

к низким концентрациям миксотиазола и антимицина. Таким образом, был сделан вывод о том, что этот процесс осуществляется bc_1 -комплексом [16]. Кроме цитохромов o и d , в дыхательной цепи *A. vinelandii* спектрально показано присутствие цитохромов b_{558} , b_{595} , c_4 , c_5 , c_{551} и c_{555} [39]. Последние два цитохрома c являются минорными и функции их неизвестны. Что касается цитохромов c_4 и c_5 , то их ролью, по-видимому, является перенос электронов от bc_1 -комплекса на цитохромоксидазу [60, 71]. Для мутантных штаммов *A. vinelandii*, лишенных генов, кодирующих либо цитохром c_4 , либо цитохром c_5 , характерна высокая ТМФД-оксидазная активность, в то время как мутантный штамм, не содержащий оба этих цитохрома c , окисляет ТМФД лишь с очень низкой скоростью [60, 71]. Согласно полученным данным, было сделано предположение о существовании двух альтернативных потоков электронов, направленных на цитохромоксидазу — как через цитохром c_4 , так и через c_5 [60].

Хинолоксидаза *bd-muna*

Терминальные оксидазы *bd*-типа широко распространены среди бактерий [62]. В лаборатории Генниса было показано наличие белков, иммунологически близких к субъединицам I и II хинолоксидазы *bd*-типа из *E. coli* у ряда грамотрицательных бактерий, в том числе и у *A. vinelandii* [50]. Впоследствии, в лаборатории Поула были клонированы нуклеотидные последовательности из *A. vinelandii*, гомологичные генам *cyd* из *E. coli* [47] и кодирующие цитохром *bd*.

Все известные на сегодняшний день оксидазы *bd*-типа являются хинолоксидазами и не содержат атомов меди. Известно, что это двух-субъединичные белки, содержащие три гема в соотношении 1:1:1 [43, 45] — низкоспиновый гем b_{558} и высокоспиновые b_{595} и d [3, 65].

Активность *bd*-оксидаз сопряжена с генерацией протонного потенциала. Однако все исследованные оксидазы *bd*-типа не способны помпировать протоны через липидный бислой, и образование $\Delta\mu_H^+$ этими ферментами происходит только за счет скалярных процессов, протекающих по обе стороны мембраны [38, 70]. Исходя из косвенных наблюдений, было предположено, что терминальная оксидаза *bd*-типа из *A. vinelandii* является несопряженным ферментом [11]. Однако в недавних исследованиях было показано, что активность этой оксидазы сопряжена с генерацией как ΔpH ? так и $\Delta\psi$ [16, 49], и стехиометрия процесса образования протонного потенциала, как и у *bd*-оксидаз из других микроорганизмов, равна $1 H^+/e^-$ [16].

Долгое время различные исследователи предполагали, что сродство *bd*-оксидаз к кислороду существенно различается у ферментов из *A. vinelandii* и *E. coli* [27]. Основанием для такого рода заключений

служили данные, полученные в ходе определения $K_m(O_2)$ для этих ферментов при дыхании целых клеток этих двух микроорганизмов. Измеряемые значения K_m для хинолоксидазы *bd*-типа из *A. vinelandii* на несколько порядков превышали соответствующие значения для *bd*-оксидазы из *E. coli*. Однако недавно было показано, что эти различия, возможно, и не так велики: для выделенных в одинаковых условиях *bd*-комплексов значения $K_m(O_2)$, определенные с использованием одного и того же субстрата (Q_1), оказались равными 1,75 мкМ и 4,1 мкМ для *E. coli* и *A. vinelandii*, соответственно [44]. Таким образом, общая структура этих *bd*-оксидаз и их сродство к кислороду довольно близки у данных микроорганизмов, что, однако, не исключает возможности различия физиологической роли этих двух ферментов.

Альтернативные терминальные оксидазы *A. vinelandii*

Как было сказано выше, на ранних этапах изучения *A. vinelandii* считалось, что терминальный участок дыхательной цепи этой бактерии содержит только две терминальные оксидазы: хинолоксидазу *d*-типа и цитохромоксидазу *o*-типа [33]. Терминальная оксидаза *o*-типа была выделена [46], однако полученный препарат не был в достаточной мере охарактеризован. Так, не были определены ни N-концевые последовательности субъединиц этой оксидазы, ни состав кофакторов данного фермента. В лаборатории Поула было проведено генетическое исследование терминальной оксидазы *o*-типа. С использованием вырожденных праймеров, подобранных на основе первичной нуклеотидной последовательности гена *cyoB* из *E. coli* (кодирующего субъединицу хинолоксидазы *bo*-типа), был амплифицирован и клонирован фрагмент ДНК *A. vinelandii*, кодирующий 183 аминокислотных остатка [52]. При сравнении этой аминокислотной последовательности с последовательностью белка *CyoB* из *E. coli* было показано, что они являются идентичными на 57%. Данный факт говорит о высокой степени гомологии этой оксидазы *A. vinelandii* с другими ферментами, представителями Сверхсемейства медьсодержащих оксидаз [84]. В лаборатории Поула был также сконструирован штамм *A. vinelandii*, неспособный к синтезу терминальной оксидазы *o*-типа. Было показано, что инактивация этого гена *A. vinelandii* приводит к исчезновению у клеток данной бактерии спектральных характеристик, приписываемых терминальной оксидазе *o*-типа [52].

В независимых исследованиях, при изучении цитохромоксидазы *cbb₃*-типа у *Rhodobacter capsulatus*, было показано, что в геноме *A. vinelandii* существует последовательность с высокой гомологией к одной из субъединиц этой оксидазы [78], что указывает на присутствие в дыхательной цепи *A. vinelandii* еще одной, ранее неизвестной, оксидазы. Более того, при анализе зависимости скорости дыхания клеток

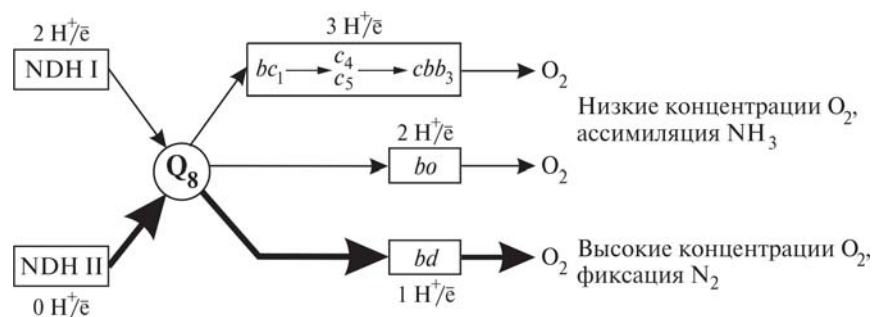


Рис. 1. Схема дыхательной цепи *A. vinelandii*.

Пути транспорта электронов при диазотрофном росте и высокой концентрации кислорода указаны толстыми стрелками.

A. vinelandii от концентрации кислорода были выявлены три кинетические компоненты, характеризующиеся разным сродством к O_2 , что также может служить косвенным указанием на наличие трех терминальных оксидаз в дыхательной цепи этой бактерии [66]. В недавних работах из *A. vinelandii* был клонирован фрагмент гена, кодирующего субъединицу ScoN терминальной оксидазы *cbb3*-типа, и был получен штамм с дефектным синтезом этого белка [1]. Оказалось, что у данного штамма полностью отсутствует цитохром c_4/c_5 оксидазная активность. Таким образом, было подтверждено предположение о том, что дыхательная цепь *A. vinelandii* наряду с хинолоксидазой *bd*-типа и терминальной оксидазой *o*-типа также содержит и цитохромоксидазу *cbb3*-типа [1] (рис. 1). Так как у мутантного по оксидазе *cbb3*-типа штамма *A. vinelandii* полностью отсутствовала цитохром c оксидазная активность, то также был сделан вывод о том, что терминальная оксидаза *o*-типа *A. vinelandii* (как и у других бактерий) является хинолоксидазой.

Роль различных терминальных оксидаз *A. vinelandii* в реализации механизма дыхательной защиты

Как было сказано выше, *A. vinelandii*, по-видимому, способна значительно понижать цитоплазматическую концентрацию кислорода за счет исключительно активного дыхания и, таким образом, защищать нитрогеназный комплекс от повреждающего действия O_2 . Было интересным установить, какая из терминальных оксидаз этой бактерии ответственна за выполнение данной функции. Такая оксидаза, по-видимому, должна индуцироваться при повышении концентрации кислорода и при отсутствии источников связанного азота в среде роста, то есть тогда, когда необходимо осуществлять механизм дыхательной защиты. Было показано, что эти условия характерны для повышенной экспрессии хинолоксидазы *bd*-типа.

Кислородзависимая регуляция хинолоксидазы *bd*-типа у *A. vinelandii*

Несмотря на сходство биохимических характеристик *bd*-оксидаз из *E. coli* и *A. vinelandii* и высокую степень гомологии этих ферментов (69% для субъединицы I и 68% для субъединицы II [58]), условия, при которых функционируют данные терминальные оксидазы, различны. У *E. coli*, как и у большинства других бактерий, *bd*-оксидаза экспрессируется, в основном, в микроаэробных условиях [31]. В то же время, *A. vinelandii* — единственный микроорганизм, демонстрирующий максимальную экспрессию цитохрома *d* при повышенном содержании кислорода в среде роста [48].

В 1990 г. Келли и соавторы выделили мутантные штаммы *A. vinelandii*, характеризующиеся повышенной и независимой от концентрации кислорода в среде роста экспрессией хинолоксидазы *bd*-типа [47]. Эти штаммы оказались неспособны к росту при низких концентрациях кислорода ($<1,5\% O_2$) как в среде, содержащей ацетат аммония, так и в среде, лимитированной по источнику связанного азота. Было показано, что данная мутация расположена внутри гена *cydR*, кодирующего белок, состоящий из 244 аминокислотных остатков [86]. CydR оказался гомологичен белкам, объединяемым в семейство Fnr-подобных регуляторных белков. Наиболее изученным представителем в этой группе является белок Fnr (от *fumarate nitrate regulation*) из *E. coli* — цитоплазматический белок, выполняющий функции как сенсора, так и регулятора транскрипции, и являющийся активатором (репрессором) анаэробной экспрессии целого ряда ферментов в клетках *E. coli* [14]. Fnr содержит на С-конце ДНК-связывающий домен, вторичная структура которого представляет собой две α -спирали, соединенные между собой β -изгибом (так называемый «спираль—петля—спираль» мотив). N-конец Fnr обогащен остатками цистеина (в том числе Cys20, Cys23, Cys29 и Cys122). Было показано, что эти цистеиновые остатки принимают участие в образовании Fe-S кластера, который ответственен за редокс-зависимую регуляцию, осуществляемую белком Fnr. При переходе клеточной культуры из анаэробных в аэробные условия, $[4Fe-4S]$ кластер белка Fnr распадается до состояния $[2Fe-2S]$, и такой процесс обращается при переходе культуры в анаэробные условия. Также было показано, что распад железосерного кластера влияет на димеризацию Fnr, а димерная форма Fnr имеет большее сродство к ДНК, чем его мономеры. Таким образом, в настоящее время механизм регуляции, осуществляемой белком Fnr, представляется следующим: в анаэробных условиях белок Fnr с интактным $[4Fe-4S]$ кластером связывается с ДНК в виде гомодимера, и происходит активация (репрессия) соответствующего оперона. Переход в аэробные условия сопровождается изменением редокс-состояния Fe-S кластера или его

повреждением, при этом Fnr распадается на мономеры и диссоциирует от ДНК-мишени [14].

Для CydR из *A. vinelandii* была показана максимальное сходство (79,5% идентичных остатков) этого белка к Anr белку из *Pseudomonas aeruginosa* (Fnr-подобный белок), гомология с Fnr из *E. coli* составляет приблизительно 50% [86]. CydR имеет цистеиновые остатки в положениях, эквивалентных Cys20, Cys23 и Cys29 и Cys122 в белке Fnr. На С-концевом участке CydR, как и в случае Fnr, содержится мотив «спираль—петля—спираль». CydR также содержит остаток глутаминовой кислоты во второй α -спирали в положении, эквивалентном E209 у Fnr. Этот остаток высококонсервативен и присутствует у всех представителей этого класса белков, что позволяет сделать вывод о сходстве участков узнавания ДНК у CydR и Fnr [86, 87]. Более того, была показана способность регуляторного белка CydR из *A. vinelandii* восстанавливать Fnr-зависимую регуляцию нитратредуктазы на Fnr-мутантном штамме *E. coli*. Этот факт особенно любопытен в связи с тем, что CydR, являясь полным аналогом Fnr, осуществляет анаэробную регуляцию у облигатно аэробного микроорганизма. Также интересно отметить, что в случае регуляции экспрессии хинолоксидазы *bd*-типа у этих двух бактерий наблюдаются значительные различия в диапазоне концентраций кислорода в среде роста, при которых происходит максимальная индукция данного фермента.

Впоследствии, Ву и соавторы [87] провели более тщательное исследование этого белка. Были идентифицированы два участка связывания CydR с ДНК в промоторной области генов *sud*. Было установлено, что этот регуляторный белок очень чувствителен к кислороду [87]. Повышенная чувствительность к O_2 белка CydR по сравнению с Fnr, с точки зрения авторов, является дополнительным фактом, подтверждающим, что цитоплазматическая концентрация кислорода у *A. vinelandii* может достигать очень низкого уровня, даже при высокой концентрации кислорода в окружающей среде.

Азотзависимая регуляция хинолоксидазы *bd*-типа

Мошири и соавторами было показано, что уровень мРНК генов *sud* в 2–3 раза выше в случае клеток, фиксирующих молекулярный азот, по сравнению с клетками, выращенными в среде с добавленным источником связанного азота [59], что хорошо согласуется с полученными ранее спектрофотометрическими данными по изменению количества цитохрома *d*. Как было описано выше, азотзависимая регуляция генов, продукты которых необходимы для осуществления процесса азотфиксации, находится под контролем регуляторных белков NifL и NifA. Исследования на штаммах, мутантных по различным

азотзависимым регуляторным белкам, показали, что эта система не является необходимой для повышенной экспрессии хинолоксидазы *bd*-типа в условиях азотфиксации. Однако было показано, что мутация по гену *ntrA*, кодирующему фактор транскрипции s^{54} , предотвращает такое 2–3-кратное повышение экспрессии этого фермента, хотя известно, что транскрипция генов *sud* осуществляется с участием σ^{70} . Таким образом, механизм азотзависимой регуляции хинолоксидазы *bd*-типа в настоящее время неизвестен. Высказывается предположение, что экспрессия этого фермента может находиться под контролем неизвестного пока белка, для проявления регуляторных свойств которого необходим продукт гена *ntrA* [59].

Влияние мутаций по различным терминальным оксидазам *A. vinelandii* на способность к diaзотрофному росту этого микроорганизма при высоких концентрациях O_2

Особенности условий индукции хинолоксидазы *bd*-типа у *A. vinelandii* указывают на то, что этот фермент играет важную роль в реализации механизма дыхательной защиты. В лаборатории Поула были сконструированы мутантные штаммы с нарушенным синтезом этого фермента. Было показано, что данные штаммы не способны расти при высокой аэрации в отсутствие источника связанного азота. Способность мутантных штаммов к diaзотрофному росту наблюдалась лишь при значительном снижении концентрации кислорода (до 1,5% O_2). Полученные результаты позволили авторам сделать вывод о том, что хинолоксидаза *bd*-типа является жизненно важным ферментом в условиях, когда необходима дыхательная защита нитрогеназного комплекса [47]. В то же время ни мутация по терминальной оксидазе *o*-типа, ни мутация по цитохромоксидазе *cbb₃*-типа не приводили к повышению чувствительности к кислороду фиксирующей N_2 культуры *A. vinelandii* [1, 52]. Более того, мутантный по обоим этим терминальным оксидазам штамм *A. vinelandii* не отличается от штамма дикого типа по своей способности к фиксации N_2 в аэробных условиях [1]. Предполагается, что эти альтернативные ветви дыхательной цепи *A. vinelandii* важны для роста в микроаэробных условиях, то есть когда нужна высокая эффективность сопряжения (запасания энергии) [36, 37].

Таким образом, на сегодняшний день принято считать, что именно терминальная оксидаза *bd*-типа ответственна за исключительно высокие скорости дыхания клеток *A. vinelandii*, позволяющие этой бактерии снижать концентрацию кислорода в цитоплазме и обеспечивать защиту нитрогеназного комплекса от повреждающего действия O_2 .

ПЕРВИЧНЫЕ ДЕГИДРОГЕНАЗЫ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ *A. vinelandii* И ИХ РОЛЬ В ОСУЩЕСТВЛЕНИИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

Ранние исследования дыхательной цепи *A. vinelandii* показали, что в ее состав входят по крайней мере следующие первичные дегидрогеназы: NADH дегидрогеназа, NADPH дегидрогеназа, сукцинат-дегидрогеназа, гидрогеназа, глицерофосфат-дегидрогеназа и малат:хинон-оксидоредуктаза [66].

На сегодняшний день роль терминальной оксидазы *bd*-типа в дыхательной защите у *A. vinelandii* не вызывает сомнения. Отличительной особенностью этой терминальной оксидазы является ее способность работать с очень высокой скоростью ($>10^4$ сек $^{-1}$). Неудивительно, что именно такая терминальная оксидаза ответственна за осуществление повышенных скоростей дыхания клеток *A. vinelandii*, что позволяет им обеспечивать защиту нитрогеназного комплекса от повреждающего действия кислорода. Однако для того, чтобы на терминальном участке дыхательной цепи мог идти процесс очень быстрого поглощения O_2 за счет работы хинолоксидазы, на начальных участках этой цепи должен существовать фермент, способный к столь же быстрому восстановлению убихинона. По-видимому, такой фермент должен окислять какой-то из основных субстратов дыхательной цепи, и его активность не должна быть сопряжена с генерацией протонного потенциала. Как известно, основным субстратом для начальных участков дыхательной цепи бактерий является NADH. Поэтому основное внимание было уделено изучению NADH:хинон-оксидоредуктаз дыхательной цепи *A. vinelandii*.

Бактериальные NADH:хинон-оксидоредуктазы

В дыхательной цепи большинства бактерий присутствуют ферменты, способные осуществлять NADH:хинон-оксидоредуктазную реакцию. Бактериальные NADH дегидрогеназы можно разделить на три основных класса — протон-транслоцирующие NADH:хинон-оксидоредуктазы (NDH I), натрий-транслоцирующие NADH:хинон-оксидоредуктазы (Na^+ -NQR) и несопряженные NADH:хинон-оксидоредуктазы (NDH II) [19, 23, 54, 89]. Эти ферменты значительно отличаются друг от друга по своей структуре, субстратной специфичности и чувствительности к различным ингибиторам. Основное отличие этих ферментов заключается в их различной способности к транслокации ионов через мембрану.

NADH:хинон-оксидоредуктаза I (NDH I) по многим своим характеристикам гомологична Комплексу I из митохондрий [5, 82]. У *E. coli* этот фермент представляет собой белок с молекулярной массой около 525 кДа. Он состоит из 13 субъединиц (NuoA-NuoN) и содержит

нековалентно связанный FMN и 6–9 Fe-S кластеров в качестве кофакторов [5, 51, 81]. NADH:хинон-оксидоредуктазная активность этого фермента чувствительна к таким ингибиторам, как капсаицин, анонин и пирицидин А [17, 19, 54, 88]. Активность NDH I сопряжена с генерацией протонного потенциала [17, 19, 21, 54]. Было показано, что соотношение H^+/e^- для Комплекса I составляет $2H^+/e^-$ [4, 83]. Эффективность генерации $\Delta\mu_H$ бактериальными NDH I изучена в значительно меньшей степени, известно лишь, что соотношение H^+/e^- для этого фермента из *E. coli* составляет по крайней мере 1,5 [21].

NADH:хинон-оксидоредуктазы II типа (NDH II) устроены гораздо проще. Они состоят всего из одной субъединицы ($M_r = 47$ кД в случае фермента из *E. coli*) и содержат только один кофактор (чаще всего — нековалентно связанный FAD) [89]. Активность этих ферментов не сопровождается переносом ионов через мембрану [17, 19, 54]. Ферменты типа NDH II не известны в митохондриях высших животных, однако аналогичные белки функционируют в митохондриях некоторых простейших, грибов и растений [2, 89]. При кажущейся простоте этот фермент до сих пор мало изучен. На настоящий момент известно, что активность NDH II, в отличие от NDH I, практически нечувствительна к таким ингибиторам, как пирицидин А и капсаицин [17, 88].

Окисление NADH дыхательной цепью *A. vinelandii*

В ранних работах были получены указания на то, что NADH:хинон-оксидоредуктазная активность суббактериальных частиц *A. vinelandii* сопровождается генерацией протонного потенциала [11]. Таким образом, это указывало на наличие фермента типа NDH I в дыхательной цепи этого микроорганизма. Известно, что при повышении концентрации кислорода в среде роста происходит значительное увеличение NADH-оксидазной активности в мембранных препаратах *A. vinelandii* [12, 42]. Этот процесс сопровождается снижением эффективности сопряжения на NADH-дегидрогеназном участке дыхательной цепи [41].

Также на ранних этапах исследования дыхательной цепи *A. vinelandii* была отмечена ее способность к окислению NADPH. Было постулировано, что эта активность обусловлена функционированием специального фермента — NADPH дегидрогеназы [13]. Было показано, что степень сопряженности NADPH:Q $_1$ оксидоредуктазной реакции с генерацией протонного потенциала значительно меньше, чем NADH:Q $_1$ оксидоредуктазной реакции [28]. Также было продемонстрировано, что у диазотрофно выращенных клеток *A. vinelandii* наблюдается индукция NADPH-оксидазной активности при повышении концентрации O_2 в среде роста [69]. Совокупность этих дан-

ных указывала на то, что в дыхательной цепи *A. vinelandii* функционируют различные NAD(P)H-дегидрогеназы с разной способностью к генерации мембранного потенциала.

В последующих работах, при анализе чувствительности к капсаицину NADH- и dNADH-оксидазных активностей мембранных препаратов *A. vinelandii*, было установлено, что окисление NADH в дыхательной цепи этой бактерии осуществляется двумя различными ферментами: сопряженной и несопряженной с генерацией протонного потенциала NADH:хинон-оксидоредуктазами (NDH I и NDH II, соответственно) [17]. Ген, кодирующий NADH-дегидрогеназу NDH II типа у *A. vinelandii*, был клонирован и секвенирован [18].

Также была изучена регуляция экспрессии различных NADH-дегидрогеназ. Было показано, что удельная активность NDH I и NDH II в клетках *A. vinelandii* зависит от концентрации кислорода и связанного азота в среде выращивания. При повышении концентрации O₂ активность несопряженной NADH дегидрогеназы увеличивается, в то время как активность сопряженного фермента уменьшается. Данная кислородзависимая регуляция соотношения NADH:хинон-оксидоредуктаз у *A. vinelandii* осуществляется с участием описанного выше белка CydR [17]. При переходе культуры клеток *A. vinelandii* к диазотрофному росту активность NDH II увеличивается, а активность NDH I не изменяется. Таким образом, биохимические свойства NDH II и, особенно, условия индукции этого фермента у *A. vinelandii* указывают на его возможную роль в реализации механизма дыхательной защиты.

Для проверки этой гипотезы был сконструирован штамм *A. vinelandii* с генетически инактивированным NDH II. В соответствии с предсказаниями было установлено, что скорость дыхания клеток этого штамма значительно ниже по сравнению с клетками дикого типа. Данный штамм оказался неспособным к диазотрофному росту при высокой концентрации O₂, в то время как ростовые характеристики этого штамма в содержащей ацетат аммония среде не отличались от роста штамма дикого типа. Мутантный по NDH II штамм *A. vinelandii* был способен к диазотрофному росту только при пониженной концентрации кислорода [18]. Совокупность полученных данных позволила авторам сделать вывод о том, что наряду с хинолоксидазой *bd*-типа несопряженная NADH:хинон-оксидоредуктаза также необходима для осуществления дыхательной защиты нитрогеназного комплекса *A. vinelandii*. Также было продемонстрировано, что описанная выше NADPH-оксидазная активность дыхательной цепи *A. vinelandii* осуществляется исключительно за счет функционирования NDH II [18].

ОСОБЕННОСТИ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЦЕПИ *A. vinelandii*, ПОЗВОЛЯЮЩИЕ ЭТОЙ БАКТЕРИИ ОСУЩЕСТВЛЯТЬ МЕХАНИЗМ ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

Описанные выше данные о структуре и свойствах дыхательной цепи *A. vinelandii* представлены в виде схемы на рис. 1. Как видно из этой схемы, при росте в условиях низкой концентрации кислорода и избытка связанного азота дыхательная цепь *A. vinelandii* преимущественно состоит из ферментов с высокой эффективностью сопряжения, а именно: NADH-дегидрогеназы I, хинолоксидазы *o*-типа, *bc*₁-комплекса и цитохромоксидазы *cbb*₃-типа. Общая эффективность генерации протонного потенциала при этом должна составлять 4–5 H⁺/e⁻ (по аналогии с дыхательной цепью митохондрий и *E. coli* [4, 21, 83, 84]). В то же время, в условиях повышенной аэрации и, особенно, в условиях дефицита связанного азота, среди ферментов дыхательной цепи преобладают несопряженные ферменты или ферменты с пониженной эффективностью запасаения энергии, а именно – NDH II и хинолоксидаза *bd*-типа. Скоординированная индукция этих двух ферментов достигается, по-видимому, за счет того, что регуляция экспрессии как NDH II, так и терминальной оксидазы *bd*-типа, находится под контролем одного и того же регуляторного белка CydR. Суммарная эффективность сопряжения для такой цепи составляет всего лишь 1 H⁺/e⁻. Таким образом, индукция ферментов дыхательной защиты приводит к четырех-пятикратному снижению эффективности генерации протонного потенциала полной электрон-транспортной цепью.

Такая низкая эффективность может приводить к тому, что дыхательная цепь *A. vinelandii* при осуществлении дыхательной защиты не испытывает лимитирования дыхательным контролем. Преимущество NDH II и хинолоксидазы *bd*-типа перед ферментами с высокой эффективностью генерации Δμ_{H⁺}, очевидно, заключается не только в возможном отсутствии эффекта дыхательного контроля, но и в очень высоких значениях удельной активности, характерных для этих ферментов – 560 мкг атом O мин⁻¹ мг белка⁻¹ [44] и 106 ммоль NADH мин⁻¹ мг белка⁻¹ [20] для хинолоксидазы *bd*-типа и NDH II, соответственно. Так, в случае NDH II из *E. coli* удельная активность этого фермента как минимум на 2–3 порядка выше, чем активность NDH I [20]. Очевидно, что такая высокая активность NDH II и хинолоксидазы *bd*-типа связана, прежде всего, с отсутствием протонтранслоцирующей функции у этих ферментов (терминальная оксидаза *bd*-типа генерирует протонный потенциал лишь за счет скалярных процессов по обе стороны мембраны [38]). По-видимому, любой фермент, активность которого связана с транслокацией протонов через мемб-

рану, устроен намного сложнее и функционирует значительно медленнее, чем несопряженный фермент. Таким образом, при лимитировании максимальной скорости дыхания клеток поверхностью мембраны, использование ферментов без протон-транслоцирующей функции и позволяет *A. vinelandii* достичь сверхвысоких скоростей дыхания, свойственных для этой бактерии и необходимых для осуществления дыхательной защиты. Конечно, за такие преимущества дыхательной цепи, состоящей лишь из NDH II и хинолоксидазы *bd*-типа, *A. vinelandii* вынужден «платить» очень низкой эффективностью запасаения энергии при дыхании, что приводит к крайне низкому экономическому коэффициенту (нормированный на количество потребленных субстратов прирост биомассы), характерному для этого микроорганизма при росте в условиях высокой аэрации [9].

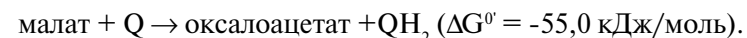
Окисление малата в цикле Кребса у *A. vinelandii*

Итак, исходя из описанных выше данных, можно предположить, что дыхательная защита нитрогеназного комплекса *A. vinelandii* достигается за счет исключительно быстрой работы дыхательной цепи, состоящей из NDH II и хинолоксидазы *bd*-типа. Однако высокая экспрессия этих ферментов, по-видимому, еще не является достаточным механизмом для diaзотрофного роста при высокой концентрации O_2 . Скорее всего, и другие метаболические пути *A. vinelandii* также должны быть адаптированы для осуществления этой уникальной особенности. В данном разделе в качестве примера хотелось бы обратить внимание на окисление малата у *A. vinelandii*. Действительно, для быстрой работы дыхательной цепи необходимо, чтобы ее активность не была лимитирована доступностью субстратов, прежде всего NADH. Для достижения этого важно, чтобы скорость оборота цикла Кребса была достаточно высокой. Высказывались предположения, что скорость этого оборота может быть лимитирована очень низкой концентрацией оксалоацетата в цитоплазме, так как положение равновесия малатдегидрогеназной реакции



сильно сдвинуто в сторону образования малата [57]. Интересно отметить, что у многих бактерий наряду с обычной, цитоплазматической формой малатдегидрогеназы присутствует также мембраносвязанная форма этого фермента (так называемая малат:хинон-оксидоредуктаза), катализирующая окисление малата не за счет восстановления NAD^+ , а за счет восстановления хинона дыхательной цепи [56]. Потенциал пары Q/QH_2 (+110 мВ при pH=7,0) значительно более положителен по сравнению с парой NAD^+/NADH (-320 мВ, pH 7,0), что

приводит к тому, что положение равновесия малат:хинон-оксидоредуктазной реакции сильно сдвинуто уже в сторону образования оксалоацетата:



Таким образом, использование *A. vinelandii* малат:хинон-оксидоредуктазы вместо малатдегидрогеназы может привести к намного более высокой скорости оборота цикла Кребса и, следовательно, к более высоким скоростям дыхания (правда, опять за счет понижения экономического коэффициента). Действительно, для *A. vinelandii* характерно наличие очень высокой малат:хинон-оксидоредуктазной активности. Данная активность значительно возрастает при повышении концентрации кислорода в среде роста [69], что указывает на возможную роль этого фермента в механизме дыхательной защиты. Более того, обычная, NAD^+ -зависимая малатдегидрогеназная активность не детектируется у этого микроорганизма (неопубликованные данные нашей группы). Однако, к сожалению, последний факт не позволяет доказать роль малат:хинон-оксидоредуктазы в механизме дыхательной защиты с помощью техники направленного мутагенеза, так как, в отличие от описанной выше ситуации с терминальными оксидазами или NADH дегидрогеназами, в данном случае отсутствует альтернативный путь осуществления изучаемой реакции.

IV. МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОК *A. vinelandii*, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ОСУЩЕСТВЛЕНИЮ МЕХАНИЗМА ДЫХАТЕЛЬНОЙ ЗАЩИТЫ

За последние годы гипотеза о дыхательной защите нитрогеназного комплекса *A. vinelandii* получила большое количество экспериментальных подтверждений и на сегодняшний день является общепринятой теорией, объясняющей уникальную способность этого микроорганизма к diaзотрофному росту при высоких концентрациях O_2 . Тем не менее, далеко не все экспериментальные данные легко укладываются в эту модель, и в последнее время неоднократно высказывались сомнения в ее справедливости [61, 79]. К наиболее существенным критическим замечаниям можно отнести следующие:

1) действительно, при повышении концентрации кислорода скорость дыхания клеток *A. vinelandii* возрастает. Однако данное увеличение дыхания наблюдается лишь в диапазоне концентраций O_2 в среде роста от 0 до 70 мкМ, дальнейшее повышение концентрации кислорода практически не вызывает увеличения удельной скорости дыхания клеток *A. vinelandii*. Таким образом, предполагается функционирование каких-то добавочных механизмов адаптации к повышенным концентрациям кислорода.

2) теоретические расчеты скорости поступления O_2 в бактериальную клетку показывают, что даже такая максимально высокая скорость дыхания, которая характерна для *A. vinelandii*, все равно явно недостаточна для поддержания сколько-нибудь заметного градиента концентрации кислорода между цитоплазмой и окружающей средой [79].

Попробуем рассмотреть эти вопросы подробнее:

1. Наверное, было бы неправильным подразумевать под дыхательной защитой простое увеличение скорости дыхания клеток. Увеличение градиента $[O_2]$ можно достичь за счет двух независимых процессов: (1) за счет увеличения скорости дыхания и (2) за счет уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку (возможные механизмы этого процесса будут рассмотрены ниже). Можно предположить, что при увеличении концентрации O_2 в среде роста от 0 до 70 мкМ работает преимущественно первый механизм, дальнейшее же возрастание $[O_2]$ уже не может быть компенсировано повышением дыхания (либо за счет полного насыщения внутренней мембраны ферментами дыхательной цепи, либо за счет лимитирования дыхания скоростью поступления субстратов в клетку). По-видимому, в этих условиях *A. vinelandii* осуществляет защиту нитрогеназного комплекса за счет уменьшения скорости потока кислорода в клетку. Хотелось бы отметить, что такую регуляцию диффузии кислорода нельзя рассматривать в качестве отдельного механизма защиты нитрогеназного комплекса, так как это исключительно пассивная мера, и она, сама по себе, не способна привести к формированию градиента $[O_2]$. Только процесс активного дыхания может служить движущей силой для этого процесса. Таким образом, механизм дыхательной защиты должен состоять из двух процессов: (1) увеличения скорости дыхания и (2) уменьшения скорости диффузии кислорода в клетку.

2. Конечно же, лучшим ответом на второй вопрос было бы прямое измерение внутриклеточной концентрации O_2 у *A. vinelandii*. Однако, на сегодняшний день еще не разработаны методические подходы для подобного рода измерений. Поэтому нам было важно критически разобрать опубликованные ранее теоретические расчеты скорости поступления кислорода в бактериальную клетку [79]. В основу этих расчетов бралась формула $J_x = D \cdot A \cdot [O_2^{\text{среды}}] / r_0$, где J_x — поток кислорода внутрь клетки, D — коэффициент диффузии кислорода, A — площадь поверхности бактериальной клетки, r_0 — радиус клетки. Эти расчеты подразумевают, что за счет осуществляемого при выращивании бактерий активного перемешивания среды концентрация кислорода снаружи клетки везде постоянна (то есть не зависит от расстояния от клетки) и равна $[O_2]$ в среде роста. Однако из-за существования эффекта неперемешиваемого слоя на границе раздела фаз (в данном

случае на границе клетка/среда) это, по-видимому, не так, что подтверждается многими экспериментальными измерениями [32]. Для небольших сферических объектов толщина неперемешиваемого слоя может быть достаточно существенной и обычно приблизительно равна их радиусу. Таким образом, создаваемый за счет дыхания градиент $[O_2]$ должен формироваться не на узкой границе клетка/среда, а во всем объеме неперемешиваемого слоя. Попробуем провести расчеты величины градиента кислорода в этом случае.

Рассмотрим сферическую клетку радиуса r_0 (см. схему на рис. 2А). Пусть дыхательная цепь, расположенная в клеточной мембране (то есть на расстоянии r_0 от центра клетки), является единственным потребителем кислорода. Скорость потребления O_2 одной клеткой постоянна и равна v . Будем предполагать, что на расстоянии L ($L = r_0 + l_n$, где l_n — толщина неперемешиваемого слоя вокруг клетки, рис. 2А) от центра клетки концентрация кислорода поддерживается постоянной и равна $O_2^{\text{среды}}$. Концентрация кислорода в каждой точке пространства, удаленной от центра клетки не более, чем на L , определяется решением уравнения диффузии [8], записанного в сферических координатах:

$$\frac{\partial u}{\partial t} = \frac{D}{r^2} \cdot \frac{\partial}{\partial r} \left(r^2 \frac{\partial u}{\partial r} \right). \quad (1.1)$$

Здесь D — коэффициент диффузии, а $u = u(r)$ — концентрация O_2 на расстоянии r от центра клетки. Так как в рассматриваемой нами системе есть два компартмента (шар радиуса r_0 в качестве внутренней клетки и сферический слой, ограниченный сферами радиусов r_0 и L в качестве внеклеточного пространства), то мы должны рассматривать уравнение (1.1) для каждого из них. Пусть $u^{(1)}(r)$ и $u^{(2)}(r)$ обозначают внутриклеточную и внеклеточную концентрацию кислорода, соответственно, и забуференность концентрации кислорода на расстоянии L от центра клетки будет соответствовать следующему граничному условию:

$$u^{(2)}(L) = O_2^{\text{среды}} \quad (1.2)$$

Второе граничное условие диктуется нам симметрией задачи:

$$\frac{\partial u}{\partial r}(0) = 0. \quad (1.3)$$

Это условие подразумевает отсутствие градиента кислорода в центре клетки, то есть в точке $r = 0$. Кроме того, решения $u^{(1)}(r)$ и $u^{(2)}(r)$ должны быть связаны так, чтобы в точке $r = r_0$ разность между диффузионными потоками вне и внутри клетки была равна скорости потребления кислорода дыхательной цепью:

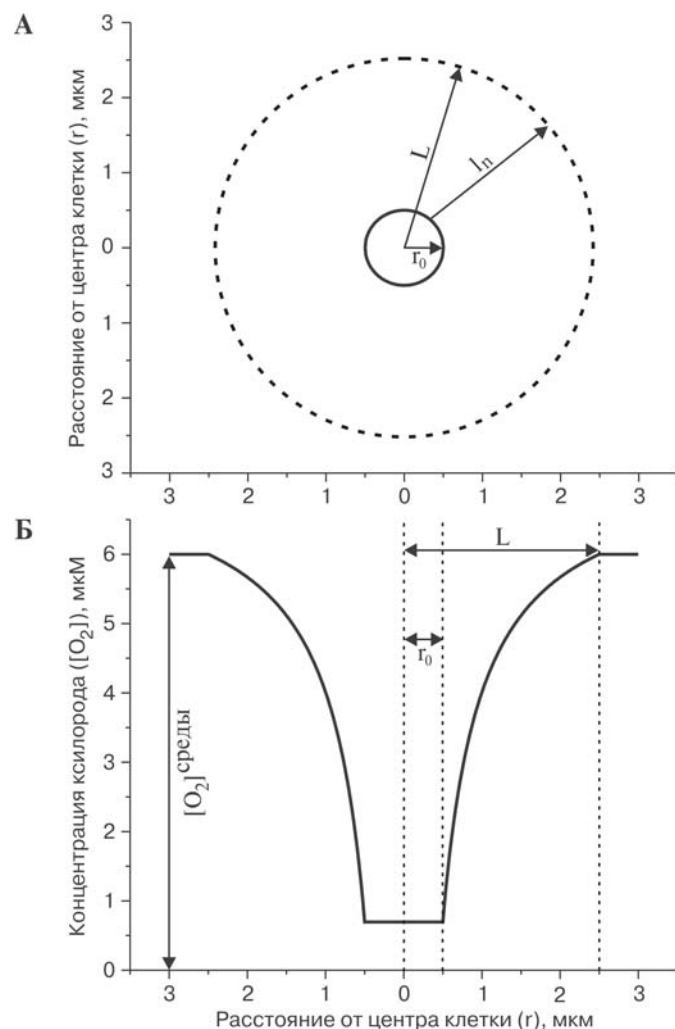


Рис. 2. Схематическое изображение клетки *A. vinelandii* (А) и зависимости концентрации кислорода от расстояния от центра клетки (Б).

Концентрация O_2 была рассчитана по формуле (1.6) с использованием следующих параметров: $v = 0,33 \cdot 10^{-10}$ мкмоль O_2 за 1 сек, $r_0 = 0,5$ мкм, $L = 2$ мкм, $D = 0,8 \cdot 10^{-7}$ дм² за 1 сек, $[O_2]_{\text{среды}} = 6$ мкМ.

$$\left(\frac{\partial u^{(2)}(r_0)}{\partial r} - \frac{\partial u^{(1)}(r_0)}{\partial r} \right) \cdot \frac{D}{r_0} = \frac{v}{4 \cdot \pi \cdot r_0^2} \quad (1.4)$$

и выполнялось условие неразрывности

$$u^{(1)}(r_0) = u^{(2)}(r_0). \quad (1.5)$$

Решение задачи (1.1)–(1.5) в предположении, что коэффициент диффузии D одинаков для обоих компартментов, дает следующее выражение для стационарного распределения кислорода внутри ($0 \leq r \leq r_0$) и вне ($r_0 \leq r \leq L$) клетки:

$$u(r) = \begin{cases} O_2^{\text{среды}} - \frac{v}{4 \cdot \pi \cdot D} \cdot \left(\frac{1}{r_0} - \frac{1}{L} \right), & 0 \leq r \leq r_0 \\ O_2^{\text{среды}} - \frac{v}{4 \cdot \pi \cdot D} \cdot \left(\frac{1}{r} - \frac{1}{L} \right), & r_0 \leq r \leq L. \end{cases} \quad (1.6)$$

Остановимся на анализе полученной формулы поподробнее. Итак, концентрация кислорода должна убывать от границы перемешиваемого слоя до клеточной мембраны и должна быть постоянной внутри клетки (рис. 2Б). Очевидно, что разница между $[O_2]_{\text{среды}}$ и $[O_2]$ внутри клетки прямо пропорциональна скорости дыхания клетки и обратно пропорциональна коэффициенту диффузии для кислорода внутри перемешиваемого слоя. Также эта разница должна убывать при увеличении радиуса клетки и возрастать при увеличении толщины перемешиваемого слоя. То есть можно предположить, какими морфологическими и биохимическими особенностями должна обладать клетка *A. vinelandii* для эффективной реализации механизма дыхательной защиты.

Прежде всего, такая гипотетическая клетка должна максимально увеличивать толщину перемешиваемого слоя вокруг себя и максимально понижать коэффициент диффузии для O_2 внутри этого слоя. Интересно отметить, что для *A. vinelandii* характерно образование слизи капсулы вокруг клетки ([25], см. также рис. 3Б). Наличие такой капсулы действительно должно приводить к значительному увеличению толщины перемешиваемого слоя и понижению коэффициента диффузии внутри него. Любопытно, что скорость продукции альгинатов — «строительного материала» капсулы — повышается при увеличении концентрации O_2 и при переходе культуры к диатрофному росту [74], то есть в тех условиях, когда необходима реализация механизма дыхательной защиты.

Далее, такая гипотетическая клетка должна максимально увеличивать скорость дыхания (здесь под скоростью дыхания мы подразуме-

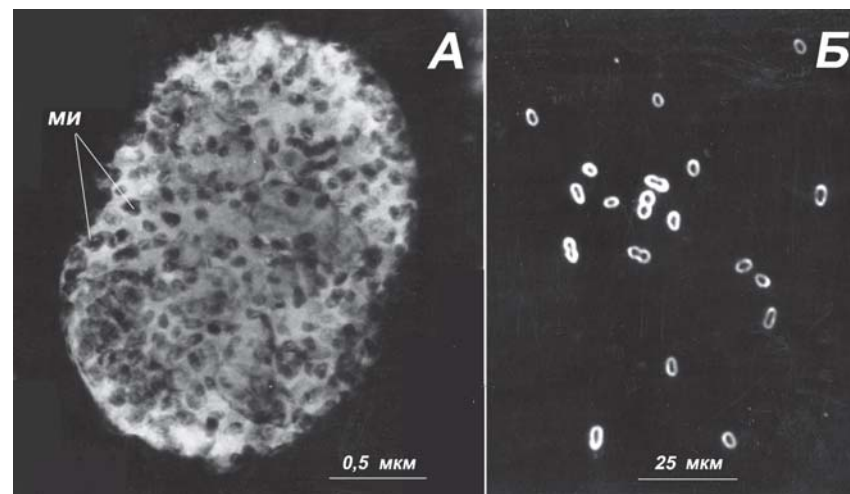


Рис. 3. А. Ультраструктура клетки *A. vinelandii*, мембранные инвагинации (МИ) указаны стрелками (фотография получена на электронном микроскопе JEM-100CX Hitachi-12 с использованием негативного контрастирования уранил-ацетатом).

Б. Структура капсул клеток *A. vinelandii* (фотография получена на световом микроскопе Univar (Reichert), негативный контраст).

меваем скорость дыхания одной клетки). Простейшим решением этой задачи было бы простое увеличение размера клетки. Так, теоретическое увеличение радиуса клетки в 2 раза приведет к увеличению поверхности мембраны в 4 раза и, соответственно, к увеличению скорости дыхания клетки также в 4 раза. Однако величина градиента O_2 обратно пропорциональна радиусу клетки, поэтому такое 4-кратное увеличение дыхания приведет лишь к 2-кратному увеличению градиента кислорода. Поэтому наиболее оптимальным путем было бы увеличение скорости дыхания клетки без увеличения ее линейных размеров. Прежде всего, это возможно за счет повышения концентрации ферментов дыхательной цепи внутри цитоплазматической мембраны и, в основном, за счет повышения концентрации очень быстро работающих ферментов (NDH II и хинолоксидазы *bd*-типа, рис. 1), лишенных протон-переносящих функций. Интересно отметить, что такая повышенная концентрация ферментов дыхательной цепи в мембране является характерной особенностью *A. vinelandii*. Так, мембранные препараты, полученные из этой бактерии демонстрируют очень высокую удельную скорость потребления O_2 , способную достигать 20–30 мкг атом O_2 /мин на 1 мг белка (данные нашей группы).

Однако, такое увеличение скорости дыхания клетки возможно лишь до какого-то уровня из-за достижения насыщения мембраны ферментами дыхательной цепи и другими белками. Таким образом, дальнейшее увеличение скорости дыхания клетки возможно лишь за счет увеличения площади мембраны. Для того, чтобы такое увеличение площади мембраны не приводило к увеличению линейных размеров клетки, эти мембранные «излишки» должны образовывать инвагинации наподобие крист в митохондриях или хроматофоров у *Rhodobacter sphaeroides*. Интересно отметить, что в полном соответствии с этим предсказанием наличие таких мембранных инвагинаций является характерной особенностью *A. vinelandii* ([67], см. также рис. 3А).

Исходя из наших теоретических расчетов, попробуем оценить величину градиента кислорода между окружающей средой и цитоплазмой *A. vinelandii*. Скорость дыхания одной клетки *A. vinelandii* может составлять $\sim 0,33 \cdot 10^{-10}$ мкмоль O_2 за 1 секунду (данные нашей группы), а радиус клетки данного микроорганизма приблизительно равен 0,5 мкм. Предположим, что толщина перемешиваемого слоя для такой клетки ~ 2 мкм, а коэффициент диффузии кислорода внутри этого слоя равен $0,8 \cdot 10^{-7}$ дм² за 1 секунду [32]. Как видно из рис. 2Б, разница в концентрации кислорода между цитоплазмой *A. vinelandii* и средой в этом случае будет составлять приблизительно 6 мкМ. Таким образом, по крайней мере в микроаэробных условиях скорости дыхания клеток *A. vinelandii* вполне достаточно для поддержания существенного градиента кислорода и для осуществления механизма дыхательной защиты.

V. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нитрогеназный комплекс, осуществляющий реакцию восстановления молекулярного азота, исключительно чувствителен к повреждающему действию кислорода. Поэтому большинство способных к азотфиксации бактерий осуществляют эту реакцию в анаэробных либо в микроаэробных условиях. Лишь микроорганизмы рода *Azotobacter* способны эффективно фиксировать молекулярный азот при очень высоких концентрациях O_2 в окружающей среде. Считается, что очень высокая дыхательная активность, характерная для *A. vinelandii*, позволяет этому микроорганизму эффективно снижать концентрацию кислорода в цитоплазме до такого низкого уровня, при котором нитрогеназный комплекс уже не испытывает повреждающего действия O_2 . Это предположение не является столь очевидным, как кажется на первый взгляд. Действительно, наличие значительного градиента кислорода между телом и окружающей средой весьма

характерно для таких крупных организмов (с очень большим отношением объема тела к его поверхности), как, например, позвоночные животные. Однако при столь малых линейных размерах организма как у клеток *A. vinelandii* (с очень малым отношением объема клетки к ее поверхности) поток O_2 в клетку за счет диффузии является уже очень значительным. Таким образом, лишь большой набор описанных выше уникальных биохимических и морфологических особенностей *A. vinelandii* позволяет ему демонстрировать исключительную способность к фиксации N_2 при высокой концентрации кислорода. Ведущая роль в этом процессе принадлежит дыхательной цепи, состоящей из несопряженной NADH:хинон-оксидоредуктазы и хинол-оксидазы *bd*-типа.

Необходимо отметить, что функционирование дыхательной цепи, состоящей практически исключительно из несопряженной NADH:хинон-оксидоредуктазы и несопряженной хинолоксидазы, характерно также для митохондрий некоторых растений (митохондрии термогенных тканей растений [2]) и грибов (окисляющие ксилоту дрожжи *Pichia stipitis* [77]). Таким образом, индукция активности несопряженной альтернативной ветви дыхательной цепи, по-видимому, является универсальным механизмом для осуществления ускоренного дыхания, что может быть использовано для понижения внутриклеточной концентрации кислорода, теплопродукции, регуляции метаболических потоков или каких-либо других функций.

ЛИТЕРАТУРА

- Берцова Ю.В., Богачев А.В. (2002) Биохимия, **67**, 750–756.
- Берцова Ю.В., Попов В.Н., Богачев А.В. (2004) Биохимия, **69**, 712–718.
- Борисов В.Б. (1996) Биохимия, **61**, 786–799.
- Галкин А.С., Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2000) Биохимия, **66**, 537–548.
- Гривенникова В.Г., Виноградов А.Д. (2003) Успехи биол. химии, **43**, 19–58.
- Львов Н.П. (1987) 43-е ежегодные Баховские чтения. М.: «Наука», 7–14.
- Манухов И.В., Берцова Ю.В., Трофимов Д.Ю., Богачев А.В., Скулачев В.П. (2000) Биохимия, **65**, 1564–1571.
- Тихонов А.Н., Самарский А.А. (1972) Уравнения математической физики. М.: «Наука».
- Хмель И.А., Габинская К.Н., Иерусалимский, Н.Д. (1965) Микробиология, **34**, 689–694.
- Хмель И.А., Габинская К.Н. (1965) Микробиология, **34**, 763–767.
- Ackrell, B.A., Jones, C.W. (1971) Eur. J. Biochem., **20**, 22–28.
- Ackrell, B.A., Jones, C.W. (1971) Eur. J. Biochem., **20**, 29–35.
- Ackrell, B.A., Erickson, S.K., Jones, C.W. (1972) Eur. J. Biochem., **26**, 387–392.
- Bauer, C.E., Elsen, S., Bird, T.H. (1999) Annu. Rev. Microbiol., **53**, 495–523.
- Bergman, B., Gallon, J.R., Rai, A.N., Stal, L.J. (1997) FEMS Microbiol. Rev., **19**, 139–185.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. (1997) FEBS Lett., **414**, 369–372.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. (1998) Biochim. Biophys. Acta, **1363**, 125–133.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V., Skulachev, V.P. (2001) J. Bacteriol., **183**, 6869–6874.
- Bertsova, Y.V., Bogachev, A.V. (2004) FEBS Lett., **563**, 207–212.
- Bjorklof, K., Zickermann, V., Finel, M. (2000) FEBS Lett., **467**, 105–110.
- Bogachev, A.V., Murtazina, R.A., Skulachev, V.P. (1996) J. Bacteriol., **178**, 6233–6237.
- Brigle, K.E., Newton, W.E., Dean, D.R. (1985) Gene, **37**, 37–44.
- Calhoun, M.W., Gennis, R.B. (1993) J. Bacteriol., **175**, 3013–3019.
- Colon-Lopez, M.S., Tang, H., Tucker, D.L., Sherman, L.A. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1473**, 363–375.
- Couperwhite, I., McCallum, M.F. (1975) Antonie Van Leeuwenhoek, **41**, 25–32.
- Dalton, H., Postgate, J.R. (1969) J. Gen. Microbiol., **56**, 307–319.
- D'Mello, R., Hill, S., Poole, R.K. (1994) Microbiology, **140**, 1395–1402.
- Erickson, S.K., Ackrell, B.A., Jones, C.W. (1972) Biochem. J., **127**, 73–74.
- Fay, P. (1992) Microbiol. Rev., **56**, 340–373.
- Ferguson, S.J. (1998) Curr. Opin. Chem. Biol., **2**, 182–193.
- Fu, H.-A., Iuchi, S., Lin, E.C.C. (1991) Mol. Gen. Genet., **226**, 209–213.
- Goin, J.T., Olson, J.S. (1979) J. Biol. Chem., **254**, 1178–1190.
- Haddock, B.A., Jones C.W. (1977) Bacteriological Reviews, **41**, 47–99.
- Hill, S. (1988) FEMS Microbiol. Rev., **54**, 111–130.
- Hill, S., Austin, S., Eydmann, T., Jones, T., Dixon, R. (1996) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **93**, 2143–2148.
- Hoffman, P.S., Morgan, T.V., DerVar-tanian, D.V. (1979) Eur. J. Biochem., **100**, 19–27.
- Hoffman, P.S., Morgan, T.V., DerVar-tanian, D.V. (1980) Eur. J. Biochem., **110**, 349–354.
- Jasaitis, A., Borisov, V.B., Belevich, N.P., Morgan, J.E., Konstantinov, A.A., Verkhovskiy, M.I. (2000) Biochemistry, **39**, 13800–13809.
- Jones, C.W., Redfearn, E.R. (1966) Biochim. Biophys. Acta, **113**, 467–481.
- Jones, C.W., Redfearn, E.R. (1967) Biochim. Biophys. Acta, **143**, 340–353.
- Jones, C.W., Ackrell, B.A., Erickson, S.K. (1971) Biochim. Biophys. Acta, **245**, 54–62.
- Jones, C.W., Brice, J.M., Wright, V., Ackrell, B.A. (1973) FEBS Lett., **29**, 77–81.
- Junemann, S. (1997) Biochim. Biophys. Acta, **1321**, 107–127.
- Junemann, S., Butterworth, P.J., Wrigglesworth, J.M. (1995) Biochemistry, **34**, 14861–14867.
- Junemann, S., Wrigglesworth, J.M. (1996) J. Biol. Chem., **270**, 16213–16220.
- Jurtshuk, P.Jr., Mueller, T.J., Wong, T.Y. (1981) Biochim. Biophys. Acta, **637**, 374–382.
- Kelly, M.J.S., Poole, R.K., Yates, M.G., Kennedy, C. (1990) J. Bacteriol., **172**, 6010–6019.
- Kolonay Jr.J.F., Moshiri, F., Gennis, R.B., Kaysser, T.M., Maier, R.J. (1994) J. Bacteriol., **176**, 4177–4181.
- Kolonay, J.F., Maier, R.J. (1997) J. Bacteriol., **179**, 3813–3817.
- Kranz, R.G., Gennis, R.B. (1985) J. Bacteriol., **161**, 709–713.
- Leif, H., Weidner, U., Berger, A., Spehr, V., Braun, M., van Heek, P., Friedrich, T., Ohnishi, T., Weiss, H. (1993) Biochem. Soc. Trans., **21**, 998–1001.
- Leung, D., J. van der Oost, Kelly, M., Saraste, M., Hill, S., Poole, R.K. (1994) FEMS Microbiol. Lett., **119**, 351–358.
- Linkerhagner, K., Oelze, J. (1996) J. Bacteriol., **177**, 5289–5293.
- Matsushita, K., Ohnishi, T., Kaback, H.R. (1987) Biochemistry, **26**, 7732–7737.

55. Maynard, R.H., Premakumar, R., Bishop, P.E. (1994) J. Bacteriol., **176**, 5583–5586.
56. Molenaar, D., van der Rest, M.E., Petrovic, S. (1998) Eur. J. Biochem., **254**, 395–403.
57. Molenaar, D., van der Rest, M.E., Drysch, A., Yucel, R. (2000) J. Bacteriol., **182**, 6884–6891.
58. Moshiri, F., Chawla, A., Maier, R.J. (1991) J. Bacteriol., **173**, 6230–6241.
59. Moshiri, F., Smith, E.G., Taormino, J.P., Maier, R.J. (1991) J. Biol. Chem., **266**, 23169–23174.
60. Ng, T.C.N., Laheri, A.N., Maier, R.J. (1995) Biochim. Biophys. Acta, **1230**, 119–129.
61. Oelze, J. (2000) FEMS Microbiol. Rev., **24**, 321–333.
62. Osborne, J.P., Gennis, R.B. (1999) Biochim. Biophys. Acta, **1410**, 32–50.
63. Peters, J.W., Fisher, K., Dean, D.R. (1995) Annu. Rev. Microbiol., **49**, 335–366.
64. Peters, J.W., Stowell, M.H.B., Soltis, S.M., Finnegan, M.G., Johnson, M.K., Rees, D.C. (1997) Biochemistry, **36**, 1181–1187.
65. Poole, R.K. (1994) Antonie van Leeuwenhoek, **65**, 289–310.
66. Poole, R.K., Hill, S. (1997) Biosci. Rep., **17**, 303–317.
67. Post, E., Golecki, J.R., Oelse, J. (1982) Arch. Microbiol., **133**, 75–82.
68. Post, E., Kleiner, D., Oelse, J. (1983) Arch. Microbiol., **134**, 68–72.
69. Post, E., Vakalopoulou, E., Oelse, J. (1983) Arch. Microbiol., **134**, 265–269.
70. Puustinen, A., Finel, M., Haltia, T., Gennis, R.B., Wikström, M. (1991) Biochemistry, **30**, 3936–3942.
71. Rey, L., Maier, R.J. (1997) J. Bacteriol., **179**, 7191–7196.
72. Ribbe, M., Gadkari, D., Meyer, O. (1997) J. Biol. Chem., **272**, 26627–26633.
73. Robson, R.L., Postgate, J.R. (1980) Annu. Rev. Microbiol., **34**, 183–207.
74. Sabra, W., Zeng, A.P., Lunsdorf, H., Deckwer, W.D. (2000) Appl. Environ. Microbiol., **66**, 4037–4044.
75. Shah, V.K., Brill, W.J. (1977) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **74**, 3249–3253.
76. Shen, J., Dean, D.R., Newton, W.E. (1997) Biochemistry, **36**, 4884–4894.
77. Shi, N.Q., Cruz, J., Sherman, F., and Jeffries, T.W. (2002) Yeast, **19**, 1203–1220.
78. Thony-Meyer, L., Beck, C., Preisig, O., Hennecke, H. (1994) Mol. Microbiol., **14**, 705–716.
79. Unden, G., Becker, S., Bongaerts, J., Holighaus, G., Schirawski, J., Six, S. (1995) Arch. Microbiol., **164**, 81–90.
80. Waugh, S.I., Paulsen, D.M., Mylona, P.H.V., Maynard, R.H., Premakumar, R., Bishop, P.E. (1995) J. Bacteriol., **177**, 1505–1510.
81. Weidner, U., Geier, S., Ptock, A., Friedrich, T., Leif, H., Weiss, H. (1993) J. Mol. Biol., **233**, 109–122.
82. Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G., Preis, D. (1991) Eur. J. Biochem., **197**, 563–576.
83. Wikström, M. (1984) FEBS Lett., **169**, 300–304.
84. Wikström, M., Bogachev, A., Finel, M., Morgan, J.E., Puustinen, A., Raitio, M., Verkhovskaya, M., Verkhovsky, M.I. (1994) Biochim. Biophys. Acta, **1187**, 106–111.
85. Williams, A.M., Wilson, P.W. (1954) J. Bacteriol. **67**, 353–360.
86. Wu, G., Hill, S., Kelly, M.J.S., Sawers, G., Poole, R.K. (1997) Microbiology, **143**, 2197–2207.
87. Wu, G., Cruz-Ramos, H., Hill, S., Green, G., Sawers, G., Poole, R.K. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 4679–4686.
88. Yagi, T. (1990) Arch. Biochem. Biophys., **281**, 305–311.
89. Yagi, T. (1991) J. Bioenerg. Biomembr., **23**, 211–225.
90. Yates, M.G. (1988). The nitrogen and sulphur cycles. I.A. Cole and S.I. Ferguson (ed.), University Press, Cambridge, **42**, 386–416.