

Paula Roszczenko¹, Magdalena Grzeszczuk¹, Elżbieta Katarzyna Jagusztyn-Krynicka^{1,*}

¹Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski
ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa

Wpłynęło w maju 2014 r.

1. Białka Dsb (disulfide bond). 2. Różnorodność procesu biogenezy cytochromów c w komórkach bakteryjnych. 2.1. Transport i redukcja apocytochromu. 2.2. Transport i przyłączanie hemu do zredukowanego apocytochromu. 3. Podsumowanie

Cytochrome c biogenesis in prokaryotic cells – the role of Dsb proteins

Abstract: The bacterial proteins of the Dsb family catalyze the formation of disulfide bridges, a post-translational modification of many extracytoplasmic proteins, leading to stabilization of their tertiary and quaternary structures. In Gram-negative bacteria this process takes place in the periplasm whereas in Gram-positive bacteria it occurs in the analogous space between the cytoplasmic membrane and the cell wall. In *E. coli* (Ec) the Dsb system operates in two partially coinciding metabolic pathways: the oxidation (DsbA and DsbB) and the isomerization/reduction (DsbC and DsbD). In the highly oxidizing environment of the periplasm, there is also a need for selected proteins to be kept in a reduced form. Assembly of c-type cytochromes, essential for energy metabolism, is a case of point. Two distinct different systems for cytochrome-c maturation was found in bacteria: system I known as Ccm (cytochrome c maturation) and system II known as Ccs system (cytochrome c synthesis). They comprise two kind of proteins: those contributing to transport and reduction of disulfide bond of CXXCH of apocytochrome c and those involved in handling of heme and playing a role in its ligation to the apocytochrome. The cytochrome c maturation process requires ligation of heme to reduced thiols of the Cys-X-X-Cys-His motif of the apocytochrome. Since DsbA, the main periplasmic dithiol-oxidase randomly introduces disulfide bonds into apocytochromes, bacterial evolved a special redox system to revert these disulfides, in highly oxidizing environment, into reduced cysteine residues. Thiol-oxidoreductases, CcmG proteins, previously designated as DsbE, play a key role in this process. Here we discuss the variety of two cytochrome c biogenesis systems and discuss some of the current problems in understanding how the process works putting special emphasis on the recent achievements concerning the process driving by CcmGs.

1. Dsb proteins. 2. Diversity of cytochrome c biogenesis. 2.1 Transport and reduction of apocytochrome c. 2.2 Heme translocation and ligation into reduced apocytochrome. 3. Conclusions

Słowa kluczowe: cytochrom c, system I, system II, białka Dsb

Key words: cytochrome c, system I, system II, Dsb proteins

1. Białka Dsb (disulfide bond)

W komórkach bakterii Gram-ujemnych proces wprowadzania wiązań disiarczkowych do białek poza-cytoplazmatycznych zachodzi w przestrzeni peryplazmatycznej, w której panują warunki utleniające, w porównaniu do redukującego środowiska cytoplazmy. Przebieg reakcji jest katalizowany przez białka z rodziny Dsb (*disulfide bond*). Większość białek Dsb posiada zwój tioredoksynowy, w którym zlokalizowany jest aktywny katalitycznie motyw CXXC. Proces tworzenia mostków disiarczkowych najdokładniej pod względem genetycznym i biochemicznym został scharakteryzowany w komórkach *Escherichia coli*. Niżej przedstawiono podstawowe informacje dotyczące funkcjonowania białek Dsb w komórkach tego gatunku bakterii. Szczegółowe informacje opisujące te procesy czytelnik znajdzie w wysmienitych pracach przeglądowych, które ukazały się w ostatnich latach [15, 34, 56].

Jednak, należy podkreślić, że szybki postęp w sekwencjonowaniu bakteryjnych genomów udokumentował różnorodność systemów Dsb występujących w komórkach bakteryjnych dotyczącą nie tylko występowania i liczby specyficznych białek Dsb ale także ich struktur trzeciorzędowych [19, 36, 52, 56]. Tak więc, proces wprowadzania mostków disiarczkowych do białek pozacytoplazmatycznych funkcjonujący w komórkach *E. coli* nie jest już uznawany za modelowy dla innych gatunków bakterii.

Białka Dsb działają przeważnie w dwóch szlakach: szlaku utleniania (DsbA, DsbB) oraz szlaku izomeryzacji/redukcji (DsbC, DsbD), gdzie ścieżka utleniania jest odpowiedzialna za tworzenie wiązań disiarczkowych pomiędzy resztami cystein w łańcuchach polipeptydowych przetransportowanych do peryplazmy, natomiast w ścieżce izomeryzacji/redukcji naprawiane są błędy szlaku utleniania. Główną oksydoreduktazą wprowadzającą wiązania disiarczkowe do białek pery-

* Autor korespondencyjny: Zakład Genetyki Bakterii, Instytut Mikrobiologii, Wydział Biologii, Uniwersytet Warszawski, ul. Miecznikowa 1, 02-096 Warszawa; E-mail: kjkryn@biol.uw.edu.pl

plazmatycznych jest monomeryczne, 21 kDa, białko DsbA. Posiada ono aktywny motyw CXXC (CPHC w EcDsbA) umiejscowiony w zwoju tioredoksynowym [53]. *In vivo* pomiędzy cysteinami motywu występuje wiązanie kowalencyjne. W wyniku reakcji powstaje stabilne wiązanie disiarczkowe w substracie, natomiast dwie reszty cystein białka DsbA znajdują się w formie zredukowanej [39]. Żeby DsbA mogło przeprowadzić kolejny cykl reakcji musi zostać ponownie utlenione. Za ten proces odpowiedzialne jest 20 kDa białko DsbB. DsbB składa się z czterech transbłonowych helis (TM1-4) z dwiema pętlami skierowanymi do peryplazmy (P1 i P2), każda z pętli posiada parę istotnych dla funkcji białka cystein. W P1 cysteiny tworzą motyw CXXC natomiast w P2 – CX₂₅C, który jest bezpośrednio zaangażowany w przekazywanie wiązania disiarczkowego do białka DsbA. DsbB, w odróżnieniu od innych białek należących do rodziny Dsb, nie posiada domeny o strukturze trzeciorzędowej typowej dla tioredoksyny. Z DsbB elektrony przekazywane są na ostateczne receptory przez kompleksy białkowe wchodzące w skład łańcucha oddechowego.

W białkach, które w sekwencji aminokwasowej posiadają więcej niż jedną parę cystein istnieje możliwość błędnego wprowadzenia wiązań disiarczkowych przez DsbA, szczególnie w przypadku kiedy mostki tworzone są pomiędzy resztami tiolowymi cystein niesąsiadujących ze sobą. Błędnie wprowadzone wiązania disiarczkowe powodują niewłaściwe zwinienie białka, które może zostać zdegradowane przez proteazy peryplazmatyczne lub ulec procesowi izomeryzacji. Za rearanżację wiązań disiarczkowych jest odpowiedzialne białko DsbC [58]. DsbC jest homodimerem, złożonym ze zwoju tioredoksynowego położonego na C-końcu białka połączonym α -helisą z N-końcowa domeną dimeryzacyjną. Dwie połączone podjednostki przypominają kształt litery V. Wnętrze tej struktury jest utworzone przez aminokwasy hydrofobowe i stanowi miejsce wiązania substratów [55]. W sekwencji aminokwasowej białka znajdują się cztery cysteiny. Jedna para tworzy wiązanie disiarczkowe, które ma istotne znaczenia dla stabilności struktury białka [51], natomiast pozostałe dwie cysteiny tworzą katalityczny motyw CXXC (CGYC w komórkach *E. coli*) i występują w nim w stanie zredukowanym. Forma dimeryczna zabezpiecza białko przed utlenieniem aktywnego motywu przez DsbB [5].

Homologiem białka DsbC występującym również w peryplazmie komórek bakterii Gram-ujemnych jest 26 kDa oksydoreduktaza DsbG. Tak jak DsbC jest homodimerem przyjmującym kształt litery V posiadającym również zwój tioredoksynowy z motywem katalitycznym, którego cysteiny są głównie w formie zredukowanej oraz domenę dimeryzacyjną. Deputat M. i wsp. wykazali, że główną funkcją białka DsbG jest

ochrona protein zawierających pojedyncze cysteiny, niezaangażowane w tworzenie wiązań disiarczkowych, przed utlenieniem ich grupy tiolowej do kwasów sulfenowych (-SOH), w wyniku działania np. reaktywnych form tlenu [14]. Kwasy sulfenowe są wysoce reaktywne i szybko ulegają utlenieniu to kwasów sulfinowych (-SO₂H) lub sulfonowych (-SO₃H) [60]. Reakcje te są uważane za nieodwracalne. DsbC, DsbG oraz wspomniane niżej DsbE/CcmG występują, pomimo utleniającego środowiska przestrzeni peryplazmatycznej, w formie zredukowanej. Mechanizmy odpowiedzialne za utrzymanie ich w stanie zredukowanym opisano w dalszej części pracy przeglądowej.

W utleniających warunkach panujących w cytoplazmie niektóre białka muszą być utrzymywane w stanie zredukowanym. Przykładem tego typu procesów zachodzi ligacja hemu do zredukowanego motywu Cys-X-X-Cys-His apocytochromu [44, 71]. Za utrzymanie apocytochromu c w formie zredukowanej odpowiedzialne jest białko Dsb nazwane początkowo DsbE a obecnie CcmG (*cytochrome c maturation system*). Prezentowana praca przeglądowa opisuje rolę białek Dsb w procesie dojrzewania cytochromu c.

2. Różnorodność procesu biogenezy cytochromów c w komórkach bakteryjnych

Transport elektronów w komórce związany z procesem oddychania komórkowego lub fotosyntezy jest zależny od cytochromów c, które w odróżnieniu od innych typów cytochromów posiadają kowalencyjnie przyłączony do łańcucha polipeptydowego hem (jon żelaza związany z protoporfiryną IX). Hem wiąże się kowalencyjnie przez węgiel grupy winylowej do reszt tiolowych łańcuchów bocznych cystein motywu katalitycznego CXXCH apocytochromu c dwoma wiązaniami tioeterowymi. Występują jednak wyjątki od tego schematu jak w przypadku *Trypanosoma*, gdzie do przyłączenia kofaktora wymagane jest tylko jedno wiązanie tioeterowe przez motyw AXXCH lub FXXCH [4]. Również u niektórych gatunków bakterii zaobserwowano wiązanie się hemu do motywów CXXXCH, CXXXXCH, CX₁₅CH, CXXCK [33, 72]. Cytochromy c występują w formie rozpuszczalnej w peryplazmie lub są zakotwiczone w błonie wewnętrznej komórki bakteryjnej, w tylakoidach chloroplastów oraz przestrzeni międzybłonowej w mitochondriach. Do tej pory poznano pięć różnych systemów biogenezy cytochromu c. System I funkcjonuje w komórkach wielu gatunków bakterii Gram-ujemnych i mitochondriach roślinnych, system II występuje w komórkach bakterii Gram-dodatnich, niektórych Gram-ujemnych i chloroplastach, system III umożliwia dojrzewanie

cytochromu c w mitochondriach nieroślinnych, system IV jest specyficzny dla powstawania funkcjonalnego cytochromu b₆ biorącego udział w procesie fotosyntezy [45]. Najslabiej scharakteryzowany system V wykryto w mitochondriach świdrowców [4].

System I znany jako system Ccm (*cytochrome c maturation*) jest najbardziej złożonym szlakiem przyłączania hemu do motywu CXXH w apocytochromach. Odpowiada on za dojrzewanie cytochromu c w komórkach bakterii Gram-ujemnych (α -, γ - i części β -*proteobacteria*), *Archea* oraz mitochondriach pasożytów i roślin. Uczestniczy w nim najczęściej 9–10 białek błonowych – CcmA, CcmB, CcmC, CcmD, CcmE, CcmF, CcmG, CcmH, CcmI oraz CcdA lub DsbD. Do tej pory system ten najlepiej scharakteryzowany został w komórkach *E. coli*. W warunkach tlenowych nie obserwuje się syntezy cytochromów c w komórkach *E. coli*. W komórkach bakterii hodowanych w atmosferze beztlenowej, niefermentacyjnej z dodatkiem ostatecznych akceptorów takich jak azotany, azotyny czy N-tlenek trimetyloaminy następuje indukcja syntezy pięciu różnych cytochromów typu c [38]. Poza komórkami *E. coli* został on także przebadany w komórkach między innymi *Bradyrhizobium japonicum*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Rhodobacter capsulatus*.

Geny kodujące białka systemu II, określanego skrótem Ccs (*cytochrome c synthesis*), można odnaleźć w genomach bakterii Gram-dodatnich, sinic, niektórych β -*proteobacteria*, a także w genomach δ - i ϵ -*proteobacteria* oraz w chloroplastach roślin. Badania nad jego mechanizmem działania rozpoczęły się w połowie lat dziewięćdziesiątych XX wieku, kiedy został on zidentyfikowany w wyniku analiz genetycznych *Chlamydomonas* [80] oraz bakterii *Bacillus* sp. [46, 69] i *Bordetella* sp. [43]. Szlak biogenezy cytochromu c z udziałem systemu II jest bardziej rozpowszechniony w przyrodzie i prostszy od systemu I. Uczestniczą w nim cztery (czasami tylko trzy) związane z błonami białka: CcdA (*cytochrome c deficiency*) lub DsbD, ResA (*respiration*) warunkujące redukcję apocytochromu i ResB (CcsB) oraz ResC (CcsA) składniki syntetazy cytochromu c.

Systemy I i II występujące w komórkach organizmów prokariotycznych mają organizację modułową. W obu systemach funkcjonują dwa elementy: zespół białek warunkujący transport apocytochromu c i redukcję jego cystein w peryplazmie i grupa białek odpowiedzialnych za transport hemu i jego połączenie ze zredukowanym apocytochromem c [68].

2.1. Transport i redukcja apocytochromu

Potranslacyjny transport apocytochromów c do przestrzeni peryplazmatycznej jest zależny od białek Sec [35, 76, 79]. Wiele badań wskazuje na tworzenie wiązania disiarczkowego pomiędzy cysteinami motywu

CXXCH bezpośrednio po transporcie z cytoplazmy, co najprawdopodobniej ma na celu ochronę białka przed przedwczesną degradacją [28]. Proces ten jest katalizowany przez białka DsbA i DsbB [44]. Jednakże żeby powstała funkcjonalna cząsteczka holocytochromu c grupy tiolowe cystein motywu katalitycznego apocytochromu c muszą zostać ponownie zredukowane. Za proces redukcji bocznych cystein motywu CXXCH odpowiedzialne są zarówno w systemie I jak i II białka CcmG, początkowo nazywane DsbE. Nomenklatura dotycząca tych białek jest nieusystematyzowana, w różnych mikroorganizmach homologii DsbE nazywane są: CcmG (*E. coli*), ResA (*Bacillus subtilis*), HelX (*Rhodobacter capsulatus*), CcsX (*Bordetella pertussis*, *Wolinella succinogenes*), CycY (*B. japonicum*), HP0377 (*Helicobacter pylori*).

Białka CcmG odpowiedzialne za redukcję apocytochromu c, proces umożliwiający dołączenie hemu, są peryplazmatycznymi proteinami zakotwiczone w błonie cytoplazmatycznej komórek bakteryjnych. W badaniach przeprowadzonych przez Hodsona i wsp. udokumentowano że usunięcie sekwencji sygnałnej warunkującej zakotwiczenie ResA *B. subtilis* w błonie cytoplazmatycznej obniża aktywność szlaku biogenezy cytochromu c [37], podobnie jak w przypadku jego homologa w systemie I, białka CcmG *E. coli* [3].

Badania strukturalne. Do tej pory udało się rozwiązać strukturę trzyczłonową w przypadku pięciu białek CcmG: CcmG *B. japonicum* [21] CcmG *E. coli* [59], ResA *B. subtilis* [13], CcmG *P. aeruginosa* [18] oraz Hp0377 *H. pylori* [81].

Rozwiązane struktury trzyczłonowe białek CcmG wykazały, że posiadają one klasyczny zwój tioredoksynowy, składający się z czterech β -kartek otoczonych przez trzy α -helisy z dodatkową β -spinką do włosów zlokalizowaną na N-końcu białka. W centralnym regionie struktury znajduje się dodatkowa helisa oraz pętla, które mają istotne znaczenie w specyficznym wiązaniu apocytochromów c. Usunięcie centralnego insertu z EcCmG skutkowało utratą funkcji białka [21]. Drugą istotną cechą białek CcmG jest kwasowy charakter regionu otaczającego centrum aktywne. O kwasowym charakterze decydują trzy aminokwasy – dwa kwasy glutaminowe (Glu98 i Glu158 w BjCcmG) i kwas asparaginowy (Asp97 w Bj CcmG), które są konserwowane w większości, ale nie wszystkich CcmG. Reszty kwasowe znajdują się w odległości 5–8 Å od centrum aktywnego. Wprowadzenie mutacji punktowych (zamiana tych aminokwasów na alaniny) skutkowało obniżeniem poziomu holocytochromu c w stosunku do szczepów z dziką wersją CcmG. Białko TlpA *B. japonicum* też biorące udział w biogenezie cytochromu c nie posiada kwasowego regionu otaczającego centrum aktywne i w strukturze jego centralny insert nie tworzy charakterystycznego zagłębienia. Te cechy strukturalne

ralne skutkują szerszą specyficznością substratową [20]. CcmG jak inne tiolowo-disulfidowe oksydoreduktazy posiadają zlokalizowany w obrębie zwoju tioredoksynowego, na N-końcu pierwszej helisy, aktywny motyw CXXC, decydujący o właściwościach fizyko-chemicznych i aktywności tych tiolowych reduktaz. Fabianek i wsp. wykazali, że zamiana cystein na serynę w motywie katalitycznym białka EcCcmG nie ma wpływu na stabilność samego białka, natomiast zaobserwowano znaczące obniżenie aktywności biogenezy cytochromu [23]. Obserwacje te poczyniono również w przypadku białka ResA *B. subtilis*. Zamiana cystein na alaniny prowadzi do braku wytwarzania cytochromów c przez komórki bakteryjne, co potwierdza udział motywu w redukcji wiązań disiarczkowych [37]. Dipeptydy występujące pomiędzy dwoma cysteinami motywu CXXC nie są wśród białek CcmG konserwowane, w przeciwieństwie do tiolowo-disulfidowych oksydaz, gdzie głównie występuje motyw CPHC [36]. W strukturze trzeciorzędowej CcmG, w pobliżu motywu CXXC, występuje charakterystyczna dla białek należących do nadrodziny tioredoksyn *cis*-prolina. W komórkach *B. subtilis*, w których *cis*-prolinę ResA zastąpiono seryną obserwowano obniżoną produkcję cytochromu c o 80% w stosunku do szczepu dzikiego. Zaobserwowano, że tak zmienione białko wykazywało znacznie niższą stabilność co sugeruje udział proliny w procesie stabilizacji struktury ResA [37]. W przypadku EcCcmG zamiana prolina na alaninę nie wpłynęła na ogólną strukturę białka, choć zmieniała jego właściwości redoks. Prawdopodobnie *cis*-prolina pomaga w stabilizacji motywu katalitycznego poprzez tworzenie rozległych wiązań van der Waals'a z disiarczkami i tworzenie wiązań wodorowych z treoniną motywu CXXC. Dodatkowo taka konfiguracja umożliwia tworzenie sąsiadującym aminokwasom (Ala143) wiązań wodorowych z DsbD, odpowiedzialnym za redukcję EcCcmG [59].

Rozwiązanie struktury trzeciorzędowe białka ResA w formie zredukowanej i utlenionej przy użyciu rentgenowskiej analizy strukturalnej i spektroskopii NMR oraz analizy wiązania modelowego peptydu przypominającego utlenioną formę apocytochromu c pozwoliły na zaproponowanie modelu funkcjonowania białka. Wykazano, że proteina podlega znaczącym zmianom konformacyjnym w zależności od stanu redoks. Zredukowanie wiązania disiarczkowego pomiędzy Cys73 i Cys76 doprowadza do zwiększenia odległości pomiędzy atomami siarki i licznych dalszych zmian konformacyjnych. W konsekwencji jedynie w stanie zredukowanym dochodzi do wytworzenia zagłębienia złożonego z wielu hydrofobowych i polarnych reszt aminokwasowych i zmianie ulega ładunek powierzchni białka. W stanie utlenionym powierzchnia białka w okolicy motywu aktywnego jest hydrofobowa a w stanie zredukowanym po otwarciu zagłębienia raczej zasa-

dowa. Zaproponowany model zakłada, że połączenie apocytochromu c z ResA doprowadza do zmian konformacyjnych a Glu80 jest aminokwasem reagującym z His motywu CXXCH apocytochromu C (tzw. klips histydynowy), decydującym o specyficzności substratowej. Kwas glutaminowy w tej pozycji jest silnie konserwowany wśród reduktaz pozacytoplazmatycznych w przeciwieństwie do tych zlokalizowanych w cytoplazmie. Reszta aminokwasów wyściełających hydrofobowe zagłębienie warunkuje wiązanie substratu [11, 13]. Autorzy sugerują, że zmiany strukturalne zachodzące w ResA mogą mieć także miejsce w przypadku innych reduktaz tiolowych zaangażowanych w dojrzewaniu cytochromu c, co wynika z konserwatywności reszt aminokwasowych zaangażowanych w zależne od stanu redoks zmiany konformacyjne oraz podobieństwa odpowiednich fragmentów struktur pomiędzy ResA a niektórymi CcmG w formie utlenionej. Ten region struktur jest odmienny w białkach EcDsbA czy EcDsbC będących odpowiednio oksydazą i izomerazą [13]. Rozwiązanie struktur formy zredukowanej i utlenionej HP0377 nie wykazało znaczących różnic pomiędzy nimi. Dodatkowo ani aminokwasy odpowiedzialne za zmiany konformacyjne w ResA (Asn, Pro, Glu, Pro, Gly i Thr) ani te wytypowane jako odpowiedzialne za kwasowe otoczenie aktywnego miejsca niektórych CcmG [21] nie są całkowicie konserwowane w HP0377. Niektóre cechy HP0377, takie jak skład aminokwasowy centrum aktywnego, mogą sugerować rolę tego białka w procesach izomeryzacji wiązań disiarczkowych. W białku EcDsbC (izomeraza) istotną rolę decydującą o jego aktywności odgrywa arginina zlokalizowana niedaleko centrum katalicznego. Jest ona także obecna w HP0377 (Arg68). Analiza właściwości fizykochemicznych HP0377, w którym argininę zastąpiono alaniną nie wykazała wpływu tego aminokwasu ani na właściwości redoks ani na stabilność HP0377 [81].

Właściwości biochemiczne białek CcmG. Jednym z często stosowanych testów określających aktywność białek jako oksydoreduktaz jest test insulinowy, mierzący zdolność białka do katalizowania redukcji wiązania disiarczkowego pomiędzy dwoma łańcuchami insuliny w obecności DTT.

Oksydoreduktazy funkcjonujące jako reduktazy takie jak np. tioredoksyna czy białko EcDsbC wykazują w tym teście wysoką aktywność a oksydoreduktazy będące oksydazami jak np. EcDsbA średni poziom aktywności [61]. Wszystkie przebadane pod tym kątem białka CcmG (*CycY/CcmG B. japonicum*, *CcmG E. coli*, *ResA B. subtilis*, *HP0377 H. pylori*) wykazują w tym teście słabą aktywność [24, 49, 50, 81], pomimo że biorą udział w reakcji redukcji wiązania disiarczkowego. Wiąże się to najprawdopodobniej z ich wąską specyficznością substratową i aktywnością przeważnie jedynie względem apocytochromu c.

Potencjał redoks tiolowych oksydoreduktaz jest zróżnicowany. Generalnie można je zaliczyć do trzech grup: białek o wysokim (około 100 mV), średnim (110–190 mV) i niskim (ponad 200 mV) potencjale redoks. Każdy z tych typów oksydoreduktaz charakteryzuje się określoną funkcją i lokalizacją komórkową. Białka o niskim potencjale redoks to głównie cytoplazmatyczne tioredoksyny odpowiedzialne za utrzymanie cystein w stanie zredukowanym, te o średnim potencjale redoks to izomerazy odpowiedzialne za rearanżację niewłaściwie wprowadzonych wiązań disiarczkowych, a oksydoreduktazy o wysokim potencjale redoks to peryplazmatyczne oksydazy wprowadzające wiązania disiarczkowe. Potencjał redoks białek CcmG jest stosunkowo zróżnicowany. Standardowy potencjał redoks białka CcmG *P. aeruginosa* wynosi -213 mV [18], HP0377 -176 mV [81], CcmG *E. coli* -178 mV [59]. Białko CycY *B. japonicum* posiada potencjał redoks -217 mV [24] natomiast najniższy potencjał redoks ma ResA (-256 mV) [49]. Takie wartości potencjałów redoks sugerują, że białka CcmG działają jako średnie lub silne reduktory w biogenezie cytochromu c.

Istotną cechą białek Dsb jest wartość pK_a reaktywnej cysteiny motywu CXXC determinująca aktywność białka w reakcji wymiany wiązań disiarczkowych. Oksydoreduktazy są aktywne w reakcjach wprowadzania mostków disiarczkowych, gdy pierwsza nukleofilowa, cysteina motywu CXXC występuje w formie anionu tiolowego. Poziom jonizacji tej cysteiny określa wartość pK_a wskazująca w jakim pH cysteina występuje w równowadze w formie uprotonowanej i w formie anionu tiolowego. Udokumentowano ścisły związek pomiędzy wartościami pK_a a potencjałem redoks białka – im niższa wartość pK_a N-terminalnej cysteiny tym wyższy potencjał redukcyjny [49]. W przypadku CcmG *P. aeruginosa* dla N-terminalnej cysteiny motywu CXXC wartość pK_a wynosi $6,13 \pm 0,05$ zaś dla C-terminalnej $10,5 \pm 0,07$ [18]. Wartości te są zgodne z wartościami mierzonymi dla tioredoksyn, gdzie N-terminalna cysteina motywu CXXC ma pK_a bliskie 7,0 natomiast C-terminalna znacznie wyższe. Duże różnice pomiędzy wartościami pK_a są istotne, ponieważ pozwalają N-terminalnej cysteinie na nukleofilowy atak na mostek disiarczkowy, podczas gdy C-terminalna cysteina zaangażowana jest w rozdzielanie powstałej struktury [77]. Wyjątek stanowi białko ResA – obie cysteiny motywu katalitycznego posiadają wysokie wartości pK_a (powyżej 8,0), które różnią się jedynie o około 0,5 jednostki pH. Różnice te mogą być uwarunkowane różnicami aminokwasowymi dipeptydu znajdującego się wewnątrz motywu katalitycznego. Zamiana kwasu glutaminowego na glutaminę w motywie CXXC ResA powodowała spadek wartości pK_a o 1 jednostkę pH, natomiast zamiana na prolinę skutkowała spadkiem o 2,5 jednostki [49]. Zamiana motywu

tioredoksyny *E. coli* CGPC na CPHC spowodowała spadek wartości pK_a z 7,1 do 6,1, natomiast zamiana motywu CPHC białka DsbA na CGPC skutkowała wzrostem wartości pK_a o prawie trzy jednostki [13]. Pod tym względem białko Hp0377 zachowuje się nietypowo. Wstępne doświadczenia określenia pK_a nukleofilowej cysteiny motywu CSYC białka HP0377 wykazały, że wynosi ona 3,49, co jest zbliżone do wartości pK_a oksydazy EcDsbA, a jest raczej nietypowe dla białek CcmG. Tak duże różnice mogą sugerować, że HP0377 jest białkiem posiadającym szerszy zakres substratów niż inne CcmG [81].

Rola białek Dsb szlaku utleniania. Wpływ białek DsbA i DsbB lub ich homologów na proces dojrzewania cytochromów analizowano w komórkach kilku gatunków bakterii monitorując poziom cytochromu c w odpowiednich mutantach. Wyniki eksperymentów są kontrowersyjne. W większości przeprowadzonych analiz obserwowano obniżony poziom cytochromu c w komórkach z unieczynnionymi genami szlaku utleniania Dsb [57, 65, 78]. Dane eksperymentalne pozwoliły na sformułowanie hipotezy, że proces utleniania apocytochromu c po jego transporcie do peryplazmy jest etapem poprzedzającym jego redukcję przez CcmG. Jednak ostatnio opublikowane dane wskazują na różny przebieg tego procesu w zależności od warunków środowiskowych czy badanego gatunku mikroorganizmu. I tak np. w komórkach *R. capsulatus* brak produktów genów szlaku utleniania Dsb rekompensuje uszkodzenia szlaku redukcji apocytochromu c [17]. Podobnie wyniki eksperymentów przedstawione przez M a v r i d o u i wsp. sugerują, że w komórkach *E. coli* dojrzewanie apocytochromu c może zachodzić także bez udziału produktów genów *dsbA*, *ccmG* i *dsbD* [54].

Podobnie w systemie II redukcja apocytochromu c nie jest konieczna gdy unieczynniony zostanie szlak wprowadzania wiązań disiarczkowych [22]. ResA (CcmG *B. subtilis*) redukuje mostek disiarczkowy utworzony pomiędzy cysteinami w motywie CXXCH apocytochromu c przed związaniem się do niego hemu. Proces wiązania kofaktora jest katalizowany przez białko ResB i/lub ResC. Możliwe, że występuje specyficzne oddziaływanie pomiędzy białkami ResA i ResB i/lub ResC, co potencjalnie może umożliwić przyłączenie do zredukowanego apocytochromu c hemu, a nie jego utlenienie [37].

Redukcja białek CcmG. CcmG oraz opisane wyżej DsbC i DsbG występują, pomimo utleniającego środowiska przestrzeni peryplazmatycznej, w formie zredukowanej. Za utrzymanie ich w tym stanie odpowiedzialne jest przeważnie białko DsbD. DsbD składa się z trzech domen: dwie peryplazmatyczne domeny: N-końcowa o strukturze immunoglobuliny (DsbDa) oraz C-końcowa zawierająca zwój tioredoksynowy (DsbDy), które są połączone hydrofobową centralną

domeną transbłonową (DsbD β). Każda z nich zawiera aktywną w reakcjach redoks parę cystein, niezbędną do prawidłowego funkcjonowania białka [74]. Transport elektronów przez błonę wewnętrzną z udziałem białka DsbD odbywa się poprzez szereg reakcji wymiany wiązań disiarczkowych. Proces zaczyna się wraz z redukcją wiązania disiarczkowego w domenie transbłonowej DsbD przez cytoplazmatyczną tioredoksynę-1. Elektrony są przekazywane ze zredukowanych reszt cystein DsbD β na parę cystein zlokalizowaną w motywie CXXC domeny Dsb γ [40]. Dwie cysteiny zlokalizowane w domenie DsbD β muszą być dostępne zarówno dla tioredoksiny znajdującej się w cytoplazmie jak i domeny DsbD γ znajdującej się po peryplazmatycznej stronie błony wewnętrznej. Ch o S.H. i wsp. w oparciu o wyniki eksperymentalne zaproponowali, że DsbD β przyjmują strukturę klepsydry [6, 7, 9]. Z DsbD γ elektrony przekazywane są dalej na domenę DsbD α , i za jej pośrednictwem redukowane są substraty DsbD, DsbC, DsbG i CcmG [12, 31, 75].

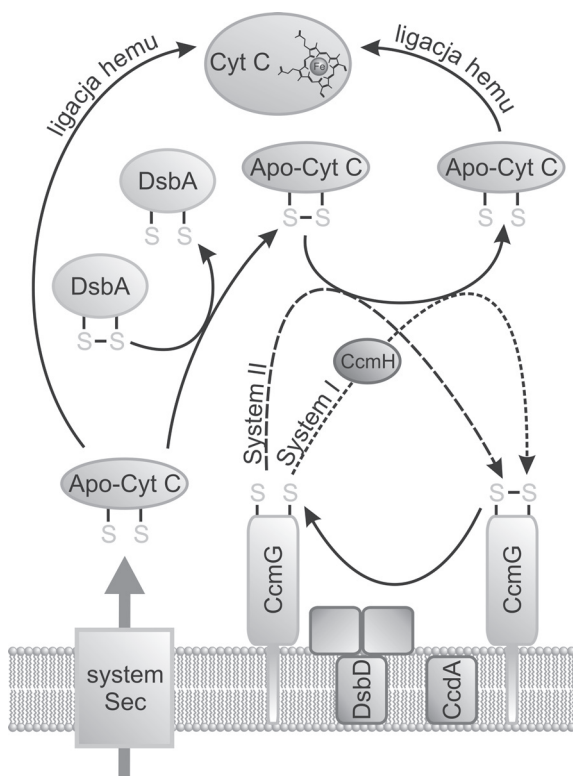
Homologi DsbD znajdowane są w komórkach wielu gatunkach bakterii, w proteomach niektórych m.in. *R. capsulatus* [16] czy *B. subtilis* [70] funkcjonuje białko CcdA, które jest skróconą wersją DsbD, wykazującą podobieństwo tylko do jego hydrofobowej domeny transmembranowej, o ograniczonej specyficzności w porównaniu z DsbD, biorące między innymi udział w redukcji niektórych homologów CcmG zarówno systemu I jak i II [41]. Badania struktur ResA i właści-

wości fizykochemicznych proteiny *in vitro*, sugerują, że oddziaływanie ResA *B. subtilis* z CcdA jest raczej niespecyficzne. Dodatkowo wykazano, że ResA bierze także udział w biogenezie StoA, białka płaszcza spor [11]. Ch o S.H. i wsp. zidentyfikowali ostatnio kolejny funkcjonalny odpowiednik DsbD, do tej pory nieopisane białko ScsB (*suppression of cooper sensitivity*), które może zastępować lub uzupełniać aktywność DsbD w szlaku izomeryzacji/redukcji. Bierze ono udział w procesie redukcji nadtlenu zachodzącym w osłonach komórkowych [8]. Białka DsbD i CcdA są ważnym elementem procesu biogenezy cytochromów c, rola ScsB w tym procesie nie była badana.

Rysunek 1 przedstawia mechanizm transportu i redukcji apocytochromu c w systemie I i II biogenezy cytochromu c.

2.2. Transport i przyłączenie hemu do zredukowanego apocytochromu

System I. W procesie translokacji hemu przez błonę wewnętrzną bakterii Gram-ujemnych oraz jego przygotowanie do związania się z apocytochromem c bierze udział siedem białek Ccm – CcmA, CcmB, CcmC, CcmD, CcmE, CcmF, CcmH, będących białkami błony cytoplazmatycznej o zróżnicowanej liczbie domen transbłonowych (TM). Proces ten obejmuje dwa etapy: związanie hemu z białkiem CcmE (holoCcmE), uwolnienie go z kompleksu transportującego (CcmABCD) a następnie transport hemu z HoloCcmE na zredukowany apocytochrom c z udziałem kompleksu CcmFH [66]. Przeprowadzone w ostatnich latach liczne badania zarówno *in vitro* jak i *in vivo* dotyczące interakcji pomiędzy białkami Ccm pozwoliły opracować schemat transportu hemu i jego łączenia ze zredukowanym apocytochromem. Centralnym składnikiem systemu Ccm wydaje się być białko CcmE, uznawane za białko opiekuńcze kofaktora i stanowiące w komórce rezerwar hemu. Hem wiąże się kowalencyjnie przez atom β -węgla grupy winylowej z atomem azotu znajdującego się w łańcuchu bocznym konserwowanej histydyny motywu białka CcmE [47, 73]. Kowalencyjne wiązanie hemu do CcmE (wytworzenie holoCcmE) wymaga aktywności CcmC i CcmD [2, 63]. Białka CcmA i CcmB należą do rodziny transporterów ABC. Przez długi czas uważano, że są one zaangażowane w proces transportu hemu do przestrzeni peryplazmatycznej. Utrata aktywności ATPazy przez CcmA nie miała jednak wpływu na wiązanie się hemu do CcmE w peryplazmie, choć aktywna forma cytochromu c w takich warunkach nie powstawała [10]. Z przeprowadzonych licznych badań wywnioskowano, że rolą białek CcmA i CcmB nie jest transport hemu, lecz uwolnienie HoloCcmE z kompleksu z CcmCD i jego transfer do miejsca tworzenia cytochromu c – kompleksu CcmFH



Rys. 1. Transport i redukcja apocytochromu c (objaśnienia w tekście)

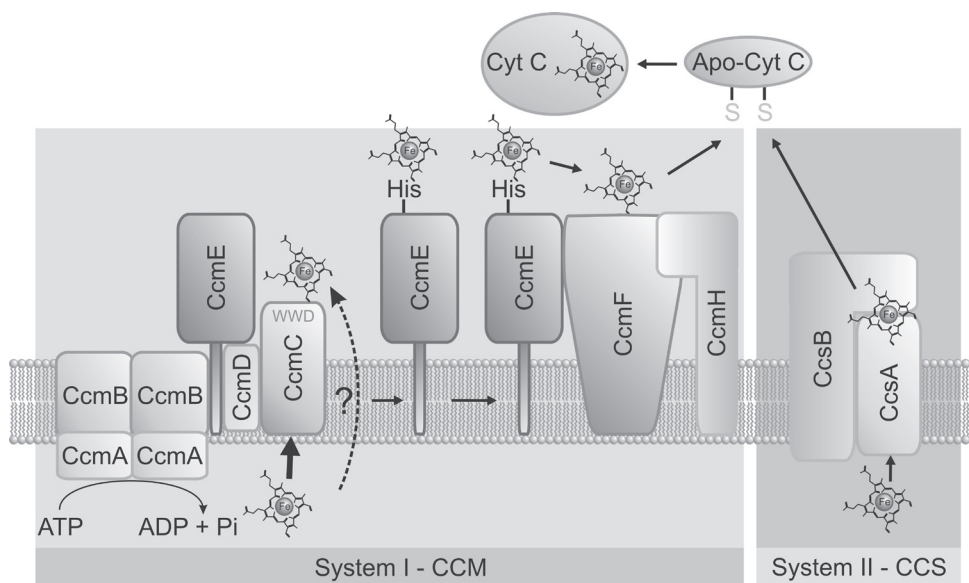
[26, 62, 67]. Badania immunobiochemiczne wskazują na oddziaływanie białek CcmA, CcmB, CcmC i CcmD [30], co może sugerować że w określonych warunkach wszystkie tworzą kompleks transportera ABC, jednak jego rola nie jest jak dotąd szczegółowo wyjaśniona. Na etapie kontaktu HoloCcmE z CcmFH ma prawdopodobnie miejsce redukcja hemu (Fe^{+3} do Fe^{+2}). CcmF pełni w komórce podwójną funkcję: reduktazy holoCcmE i syntetazy cytochromu c (kompleks CcmFH) [64].

System II. W systemie II aktywność heterodimerycznego kompleksu dwóch białek błonowych CscA (ResC) i CcsB (ResB) zapewnia zarówno transport hemu przez błonę cytoplazmatyczną, rozpoznanie apocytochromu ze zredukowanymi grupami tiolowymi jak i ligację hemu z apocytochromem. Ten kompleks spełnia podobną funkcję jak zestaw siedmiu białek Ccm systemu I. Geny *resB* i *resC* *B. subtilis* tworzą wspólną jednostkę transkrypcyjną, ale syntetyzowane są jako dwa samodzielne łańcuchy polipeptydowe. CcsB i CcsA *B. pertussis* tworzą trwały kompleks, a białko CcsB jest degradowane przy braku funkcjonalnego CcsA [25]. Natomiast w komórkach *Chlamydomonas* zmutowanych w genie *ccsB* produkcja CcsA jest niemożliwa [80]. W przypadku niektórych przedstawicieli *ε-proteobacteria* (*H. pylori*, *H. hepaticus*, *W. succinogenes*) oraz niektórych *Bacteroides* CcsA i CcsB stanowią często, choć nie zawsze (zależnie od szczepu) fuzyjne białko [27, 42].

W komórkach *B. subtilis* białko ResB (CcsB) o wielkości 62 kDa wiąże kowalencyjnie hem prawdopodobnie przez grupę tiolową Cys138 [1]. W ten proces nie są zaangażowane białka ResA (CcmG) i ResC, choć białko ResC (CcsA) również ma zdolność wiązania hemu, najprawdopodobniej przez domenę WWD (sekwencja konsensusowa WGXXWXWD, gdzie X może być

każdym aminokwasem z wyjątkiem tryptofanu. Ten sam motyw zawierają białka CcmC i CcmF systemu I biogenezy cytochromu c. Hem jest wiązany przez ResC (CcsA) przez dwie konserwowane histydyny otaczające domenę WWD [32, 67]. Także histydyny obecne w fuzyjnym białku CcsAB *H. hepaticus* są niezbędne w procesie biogenezy cytochromu c [27]. Białka biorące udział w biogenezie cytochromu zawierające motyw WWD z konserwowanymi histydynami zwane są „heme-handling proteins” [48]. Nie wyjaśniono jak dotąd jaki jest mechanizm przekazania hemu z cytoplazmy na białka błonowe systemu II. Nie wiadomo jak dochodzi do ostatniego etapu biogenezy cytochromu c czyli rozpoznanie i ligacji hemu ze zredukowanym przez CcmG apocytochromem.

Większość eksperymentów mających na celu wyjaśnienie funkcjonowania białek ResB i ResC przeprowadzono analizując ich aktywność w komórkach *E. coli*. Ekspresja białek ResB i ResC *B. subtilis* oraz CcsA i CcsB *B. pertussis* w komórkach *E. coli* z unieczynnionym operonem *ccmA-H* nie przywraca syntezy cytochromu c [1, 26]. W komórkach *E. coli* ResB pochodzące z *B. subtilis* wykrywane jest co prawda jako białko wiążące hem, ale w krótszej 27 kDa formie, bez C-końcowego fragmentu, co prawdopodobnie uniemożliwia jego prawidłowe funkcjonowanie. Dodatkowo w badaniach przeprowadzonych przez G o d d a r d i wsp. wykazano, że produkt genu *ycf5* (białko ResBC odpowiedzialne za transport hemu i ligację ze zredukowaną formą acytochromu c) *H. pylori* w komórkach *E. coli* z usuniętym operonem zawierającym geny *ccm* systemu I, może przywrócić proces biogenezy funkcjonalnych cytochromów c (analizowano proces dojrzewania cytochromu c *Paracoccus denitrificans*). Ponieważ szczep gospodarza nie kodował białek odpowiedzialnych zarówno za



Rys. 2. Transport i przyłączenie hemu do zredukowanego apocytochromu c (objaśnienia w tekście)

transport hemu jak i redukcję apocytochromu wnioskowano, że proces redukcji cytochromu nie jest niezbędny do jego dojrzenia a białko ResBC zastępuje brakujące elementy systemu Ccm gospodarza. Jednak do podłoży, na których hodowane były bakterie, dodawano czynnik redukujący 2-merkaptioetanosulfonian (MESA), który mógł pełnić funkcje nieobecnej reduktazy apocytochromu c [29]. Również kompleks białek CcmFH (systemu I) we współpracy z CcmG jest w stanie w odpowiednio zmienionych warunkach zapewnić biogenezę cytochromu c podobnie jak białka CcsAB systemu II [67].

Rysunek 2 przedstawia mechanizm transportu hemu i jego ligacji ze zredukowanym apocytochromem funkcjonujący w systemie I i II.

3. Podsumowanie

Dwa systemy biogenezy cytochromów funkcjonujące w komórkach prokariotycznych obejmują dwa, lub przez niektórych autorów wyróżniane trzy, moduły. Pomimo wielu podobieństw istnieje wiele różnic w ich funkcjonowaniu dotyczących głównie etapu transportu i ligacji hemu do zredukowanego cytochromu c. W obu systemach kluczową rolę odgrywają reduktazy Dsb odpowiedzialne za redukcję apocytochromu c w warunkach utleniających. Rozwiązanie struktur kilku białek CcmG zarówno systemu I jak i II oraz wiele badań ich właściwości fizykochemicznych pozwoliło, choć częściowo, opisać mechanizm ich działania. Nadal pozostaje jednak do wyjaśnienia czy jeden mechanizm opisany dokładnie dla ResA *B. subtilis* funkcjonuje w komórkach innych gatunków bakterii. Wyjaśniono mechanizm reredukcji CcmG przez błonowe białko DsbD, ale mechanizm oddziaływania CcmG z jego skróconym homologiem CcdA jest całkowicie niezrozumiały. Prowadzone ostatnio badania udokumentowały, że tylko pewna ilość apocytochromu c ulega utlenieniu przez tiolowe oksydazy. Jakie czynniki decydują o tym procesie jest nadal niejasne.

Podziękowania

Praca powstała przy realizacji grantu NCN (Opus) 2012/05/B/NZ1/00039. Autorzy dziękują mgr. Jakubowi Jopkowi za stworzenie ilustracji wykorzystanych w publikacji.

Piśmiennictwo*

1. Ahuja U., Kjelgaard P., Schulz B.L., Thony-Meyer L., Hederstedt L.: Haem-delivery proteins in cytochrome c maturation System II. *Mol. Microbiol.* **73**, 1058–1071 (2009)

2. Ahuja U., Thony-Meyer L.: CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome c maturation. *J. Biol. Chem.* **280**, 236–243 (2005)
3. Ahuja U., Thony-Meyer L.: The membrane anchors of the heme chaperone CcmE and the periplasmic thioredoxin CcmG are functionally important. *FEBS Lett.* **580**, 216–222 (2006)
4. Allen J.W., Ginger M.L., Ferguson S.J.: Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial c-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochem. J.* **383**, 537–542 (2004)
5. Arredondo S.A., Chen T.F., Riggs A.F., Gilbert H.F., Georgiou G.: Role of dimerization in the catalytic properties of the *Escherichia coli* disulfide isomerase DsbC. *J. Biol. Chem.* **284**, 23972–23979 (2009)
6. Cho S.H., Beckwith J.: Mutations of the membrane-bound disulfide reductase DsbD that block electron transfer steps from cytoplasm to periplasm in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **188**, 5066–5076 (2006)
7. Cho S.H., Beckwith J.: Two snapshots of electron transport across the membrane: insights into the structure and function of DsbD. *J. Biol. Chem.* **284**, 11416–11424 (2009)
8. Cho S.H., Parsonage D., Thurston C., Dutton R.J., Poole L.B., Collet J.F., Beckwith J.: A new family of membrane electron transporters and its substrates, including a new cell envelope peroxiredoxin, reveal a broadened reductive capacity of the oxidative bacterial cell envelope. *MBio*, **3**, (2012)
9. Cho S.H., Porat A., Ye J., Beckwith J.: Redox-active cysteines of a membrane electron transporter DsbD show dual compartment accessibility. *EMBO J.* **26**, 3509–3520 (2007)
10. Christensen O., Harvat E.M., Thony-Meyer L., Ferguson S.J., Stevens J.M.: Loss of ATP hydrolysis activity by CcmAB results in loss of c-type cytochrome synthesis and incomplete processing of CcmE. *FEBS J.* **274**, 2322–2332 (2007)
11. Colbert C.L., Wu Q., Erbel P.J., Gardner K.H., Deisenhofer J.: Mechanism of substrate specificity in *Bacillus subtilis* ResA, a thioredoxin-like protein involved in cytochrome c maturation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 4410–4415 (2006)
12. Collet J.F., Riemer J., Bader M.W., Bardwell J.C.: Reconstitution of a disulfide isomerization system. *J. Biol. Chem.* **277**, 26886–26892 (2002)
13. Crow A., Acheson R.M., Le Brun N.E., Oubrie A.: Structural basis of Redox-coupled protein substrate selection by the cytochrome c biosynthesis protein ResA. *J. Biol. Chem.* **279**, 23654–23660 (2004)
14. Depuydt M., Leonard S.E., Vertommen D., Denoncin K., Morosomme P., Wahni K., Messens J., Carroll K.S., Collet J.F.: A periplasmic reducing system protects single cysteine residues from oxidation. *Science*, **326**, 1109–1111 (2009)
15. Depuydt M., Messens J., Collet J.F.: How proteins form disulfide bonds. *Antioxid. Redox. Signal.* **15**, 49–66 (2011)
16. Deshmukh M., Brasseur G., Daldal F.: Novel *Rhodobacter capsulatus* genes required for the biogenesis of various c-type cytochromes. *Mol. Microbiol.* **35**, 123–138 (2000)
17. Deshmukh M., Turkarlan S., Astor D., Valkova-Valchanova M., Daldal F.: The dithiol:disulfide oxidoreductases DsbA and DsbB of *Rhodobacter capsulatus* are not directly involved in cytochrome c biogenesis, but their inactivation restores the cytochrome c biogenesis defect of CcdA-null mutants. *J. Bacteriol.* **185**, 3361–3372 (2003)
18. Di Matteo A., Calosci N., Gianni S., Jemth P., Brunori M., Travaglini-Allocatelli C.: Structural and functional characterization of CcmG from *Pseudomonas aeruginosa*, a key component of the bacterial cytochrome c maturation apparatus. *Proteins*, **78**, 2213–2221 (2010)

* Cytowana literatura jest reprezentatywna aczkolwiek nie wyczerpująca

19. Dutton R.J., Boyd D., Berkmen M., Beckwith J.: Bacterial species exhibit diversity in their mechanisms and capacity for protein disulfide bond formation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 11933–11938 (2008)
20. Edeling M.A., Ahuja U., Heras B., Thony-Meyer L., Martin J.L.: The acidic nature of the CcmG redox-active center is important for cytochrome c maturation in *E. coli*. *J. Bacteriol.* **186**, 4030–4033 (2004)
21. Edeling M.A., Guddat L.W., Fabianek R.A., Thony-Meyer L., Martin J.L.: Structure of CcmG/DsbE at 1.14 Å resolution: high-fidelity reducing activity in an indiscriminately oxidizing environment. *Structure*, **10**, 973–979 (2002)
22. Erlendsson L.S., Acheson R.M., Hederstedt L., Le Brun N.E.: *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome c synthesis. *J. Biol. Chem.* **278**, 17852–17858 (2003)
23. Fabianek R.A., Hennecke H., Thony-Meyer L.: The active-site cysteines of the periplasmic thioredoxin-like protein CcmG of *E. coli* are important but not essential for cytochrome c maturation *in vivo*. *J. Bacteriol.* **180**, 1947–1950 (1998)
24. Fabianek R.A., Huber-Wunderlich M., Glockshuber R., Kunzler P., Hennecke H., Thony-Meyer L.: Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CysY protein, a membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of c-type cytochromes. *J. Biol. Chem.* **272**, 4467–4473 (1997)
25. Feissner R.E., Beckett C.S., Loughman J.A., Kranz R.G.: Mutations in cytochrome assembly and periplasmic redox pathways in *Bordetella pertussis*. *J. Bacteriol.* **187**, 3941–3949 (2005)
26. Feissner R.E., Richard-Fogal C.L., Frawley E.R., Kranz R.G.: ABC transporter-mediated release of a haem chaperone allows cytochrome c biogenesis. *Mol. Microbiol.* **61**, 219–231 (2006)
27. Frawley E.R., Kranz R.G.: CcsBA is a cytochrome c synthetase that also functions in heme transport. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 10201–10206 (2009)
28. Gao T., O'Brian M.R.: Control of DegP-dependent degradation of c-type cytochromes by heme and the cytochrome c maturation system in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 6253–6259 (2007)
29. Goddard A.D., Stevens J.M., Rondelet A., Nomerotskaia E., Allen J.W., Ferguson S.J.: Comparing the substrate specificities of cytochrome c biogenesis Systems I and II: bioenergetics. *FEBS J.* **277**, 726–737 (2010)
30. Goldman B.S., Beckman D.L., Bali A., Monika E.M., Gabbert K.K., Kranz R.G.: Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome c biogenesis. *J. Mol. Biol.* **268**, 724–738 (1997)
31. Haebel P.W., Goldstone D., Katzen F., Beckwith J., Metcalf P.: The disulfide bond isomerase DsbC is activated by an immunoglobulin-fold thiol oxidoreductase: crystal structure of the DsbC-DsbD complex. *EMBO J.* **21**, 4774–4784 (2002)
32. Hamel P.P., Dreyfuss B.W., Xie Z., Gabilly S.T., Merchant S.: Essential histidine and tryptophan residues in CcsA, a system II polytopic cytochrome c biogenesis protein. *J. Biol. Chem.* **278**, 2593–2603 (2003)
33. Hartshorne R.S., Kern M., Meyer B., Clarke T.A., Karas M., Richardson D.J., Simon J.: A dedicated haem lyase is required for the maturation of a novel bacterial cytochrome c with unconventional covalent haem binding. *Mol. Microbiol.* **64**, 1049–1060 (2007)
34. Hatahet F., Boyd D., Beckwith J.: Disulfide bond formation in prokaryotes: History, diversity and design. *Biochim. Biophys. Acta.* (2014)
35. Helde R., Wiesler B., Wachter E., Neubüser A., Hoffschulte H.K., Hengelage T., Schimz K.L., Stuart R.A., Müller M.: Comparative characterization of SecA from the alpha-subclass purple bacterium *Rhodobacter capsulatus* and *Escherichia coli* reveals differences in membrane and precursor specificity. *J. Bacteriol.* **179**, 4003–4012 (1997)
36. Heras B., Shouldice S.R., Totsika M., Scanlon M.J., Schembri M.A., Martin J.L.: DSB proteins and bacterial pathogenicity. *Nat. Rev. Microbiol.* **7**, 215–225 (2009)
37. Hodson C.T., Lewin A., Hederstedt L., Le Brun N.E.: The active-site cysteinyls and hydrophobic cavity residues of ResA are important for cytochrome c maturation in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **190**, 4697–4705 (2008)
38. Iobbi-Nivol C., Crooke H., Griffiths L., Grove J., Hussain H., Pommier J., Mejean V., Cole J.A.: A reassessment of the range of c-type cytochromes synthesized by *Escherichia coli* K-12. *FEMS Microbiol. Lett.* **119**, 89–94 (1994)
39. Kadokura H., Beckwith J.: Detecting folding intermediates of a protein as it passes through the bacterial translocation channel. *Cell*, **138**, 1164–1173 (2009)
40. Katzen F., Beckwith J.: Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, **103**, 769–779 (2000)
41. Katzen F., Deshmukh M., Daldal F., Beckwith J.: Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *EMBO J.* **21**, 3960–3969 (2002)
42. Kern M., Eisel F., Scheithauer J., Kranz R.G., Simon J.: Substrate specificity of three cytochrome c haem lyase isoenzymes from *Wolinella succinogenes*: unconventional haem c binding motifs are not sufficient for haem c attachment by Nrfl and CcsA1. *Mol. Microbiol.* **75**, 122–137 (2010)
43. Kranz R.G., Beckett C.S., Goldman B.S.: 2002. Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome c assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome c biogenesis pathway. *Res. Microbiol.* **153**, 1–6 (2002)
44. Kranz R.G., Richard-Fogal C., Taylor J.S., Frawley E.R.: Cytochrome c biogenesis: mechanisms for covalent modifications and trafficking of heme and for heme-iron redox control. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **73**, 510–528 (2009)
45. Kuras R., Saint-Marcoux D., Wollman F.A., de Vitry C.: A specific c-type cytochrome maturation system is required for oxygenic photosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 9906–9910 (2007)
46. Le Brun N.E., Bengtsson J., Hederstedt L.: Genes required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol. Microbiol.* **36**, 638–650 (2000)
47. Lee D., Pervushin K., Bischof D., Braun M., Thöny-Meyer L.: Unusual heme-histidine bond in the active site of a chaperone. *J. Am. Chem. Soc.* **127**, 3716–3717 (2005)
48. Lee J.H., Harvat E.M., Stevens J.M., Ferguson S.J., Saier M.H. Jr.: Evolutionary origins of members of a superfamily of integral membrane cytochrome c biogenesis proteins. *Biochem. Biophys. Acta.* **1768**, 2164–2181 (2007)
49. Lewin A., Crow A., Hodson C.T., Hederstedt L., Le Brun N.E.: Effects of substitutions in the CXXC active-site motif of the extracytoplasmic thioredoxin ResA. *Biochem. J.* **414**, 81–91 (2008)
50. Li Q., Hu H.Y., Wang W.Q., Xu G.J.: Structural and redox properties of the leaderless DsbE (CcmG) protein: both active-site cysteines of the reduced form are involved in its function in the *Escherichia coli* periplasm. *Biol. Chem.* **382**, 1679–1686 (2001)
51. Liu X., Wang C.C.: Disulfide-dependent folding and export of *Escherichia coli* DsbC. *J. Biol. Chem.* **276**, 1146–1151 (2001)
52. Łasica A.M., Jagusztyn-Krynicka E.K.: The role of Dsb proteins of Gram-negative bacteria in the process of pathogenesis. *FEMS Microbiol. Rev.* **31**, 626–636 (2007)

53. Martin J.L., Bardwell J.C., Kuriyan J.: Crystal structure of the DsbA protein required for disulphide bond formation *in vivo*. *Nature*, **365**, 464–468 (1993)
54. Mavridou D.A., Ferguson S.J., Stevens J.M.: The interplay between the disulfide bond formation pathway and cytochrome c maturation in *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **586**, 1702–1707 (2012)
55. McCarthy A.A., Haebel P.W., Törrönen A., Rybin V., Baker E.N., Metcalf P.: Crystal structure of the protein disulfide bond isomerase, DsbC, from *Escherichia coli*. *Nat. Struct. Biol.* **7**, 196–199 (2000)
56. McMahon R.M., Premkumar L., Martin J.L.: Four structural subclasses of the antiviral drug target disulfide oxidoreductase DsbA provide a platform for design of subclass-specific inhibitors. *Biochim. Biophys. Acta* (2014)
57. Metheringham R., Griffiths L., Crooke H., Forsythe S., Cole J.: An essential role for DsbA in cytochrome c synthesis and formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K-12. *Arch. Microbiol.* **164**, 301–307 (1995)
58. Missiakas D., Georgopoulos C., Raina S.: The *Escherichia coli dsbC (xprA)* gene encodes a periplasmic protein involved in disulfide bond formation. *EMBO J.* **13**, 2013–2020 (1994)
59. Ouyang N., Gao Y.G., Hu H.Y., Xia Z.X.: Crystal structures of *E. coli* CcmG and its mutants reveal key roles of the N-terminal beta-sheet and the fingerprint region. *Proteins*, **65**, 1021–1031 (2006)
60. Paulsen C.E., Carroll K.S.: Orchestrating redox signaling networks through regulatory cysteine switches. *ACS. Chem. Biol.* **5**, 47–62 (2010)
61. Ren G., Stephan D., Xu Z., Zheng Y., Tang D., Harrison R.S., Kurz M., Jarrott R., Shouldice S.R., Hiniker A., Martin J.L., Heras B., Bardwell J.C.: Properties of the thioredoxin fold superfamily are modulated by a single amino acid residue. *J. Biol. Chem.* **284**, 10150–10159 (2009)
62. Ren Q., Ahuja U., Thony-Meyer L.: A bacterial cytochrome c heme lyase. CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome c. *J. Biol. Chem.* **277**, 7657–7663 (2002)
63. Richard-Fogal C., Kranz R.G.: The CcmC:heme:CcmE complex in heme trafficking and cytochrome c biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **401**, 350–362 (2010)
64. Richard-Fogal C.L., Frawley E.R., Bonner E.R., Zhu H., San Francisco B., Kranz R.G.: A conserved haem redox and trafficking pathway for cofactor attachment. *EMBO J.* **28**, 2349–2359 (2009)
65. Sambongi Y., Ferguson S.J.: Mutants of *Escherichia coli* lacking disulphide oxidoreductases DsbA and DsbB cannot synthesise an exogenous monohaem c-type cytochrome except in the presence of disulphide compounds. *FEBS Lett.* **398**, 265–268 (1996)
66. San Francisco B., Kranz R.G.: Interaction of holoCcmE with CcmF in heme trafficking and cytochrome c biosynthesis. *J. Mol. Biol.* **426**, 570–585 (2014)
67. San Francisco B., Sutherland M.C., Kranz R.G.: The CcmFH complex is the system I holo-cytochrome c synthetase: engineering cytochrome c maturation independent of CcmABCDE. *Mol. Microbiol.* **91**, 996–1008 (2014)
68. Sanders C., Turkarlan S., Lee D.W., Daldal F.: Cytochrome c biogenesis: the Ccm system. *Trends Microbiol.* **18**, 266–274 (2010)
69. Schiött T., Throne-Holst M., Hederstedt L.: *Bacillus subtilis* CcdA-defective mutants are blocked in a late step of cytochrome c biogenesis. *J. Bacteriol.* **179**, 4523–4529 (1997)
70. Schiött T., von Wachenfeldt C., Hederstedt L.: Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome c synthesis in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* **179**, 1962–1973 (1997)
71. Simon J., Hederstedt L.: Composition and function of cytochrome c biogenesis System II. *FEBS J.* **278**, 4179–4188 (2011)
72. Stevens J.M., Daltrop O., Allen J.W., Ferguson S.J.: C-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Acc. Chem. Res.* **37**, 999–1007 (2004)
73. Stevens J.M., Daltrop O., Higham C.W., Ferguson S.J.: Interaction of heme with variants of the heme chaperone CcmE carrying active site mutations and a cleavable N-terminal His tag. *J. Biol. Chem.* **278**, 20500–20506 (2003)
74. Stewart E.J., Katzen F., Beckwith J.: Six conserved cysteines of the membrane protein DsbD are required for the transfer of electrons from the cytoplasm to the periplasm of *Escherichia coli*. *EMBO J.* **18**, 5963–5971 (1999)
75. Stirnimann C.U., Rozhkova A., Grauschopf U., Grütter M.G., Glockshuber R., Capitani G.: Structural basis and kinetics of DsbD-dependent cytochrome c maturation. *Structure*, **13**, 985–993 (2005)
76. Thony-Meyer L., Kunzler P.: Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome c depend on sec and Zep, but not on the ccm gene products. *Eur. J. Biochem.* **246**, 794–799 (1997)
77. Travaglini-Allocatelli C.: Protein machineries involved in the attachment of heme to cytochrome c: Protein structures and molecular mechanisms. *Scientifica*, 2013, 1–17 (2013)
78. Turkarlan S., Sanders C., Ekici S., Daldal F.: Compensatory thio-redox interactions between DsbA, CcdA and CcmG unveil the apocytochrome c holdase role of CcmG during cytochrome c maturation. *Mol. Microbiol.* **70**, 652–666 (2008)
79. Wieseler B., Schiltz E., Müller M.: Identification and solubilization of a signal peptidase from the phototrophic bacterium *Rhodobacter capsulatus*. *FEBS Lett.* **298**, 273–276 (1992)
80. Xie Z., Culler D., Dreyfuss B.W., Kuras R., Wollman F.A., Girard-Bascou J., Merchant S.: Genetic analysis of chloroplast c-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics*, **148**, 681–692 (1998)
81. Yoon J.Y., Kim J., An D.R., Lee S.J., Kim H.S., Im H.N., Yoon H.J., Kim J.Y., Kim S.J., Han B.W., Suh S.W.: Structural and functional characterization of HP0377, a thioredoxin-fold protein from *Helicobacter pylori*. *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* **69**, 735–46 (2013)